

Aus dem Institut für chemische Physiologie der
Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
Direktor: Prof. Dr. R. K. Zahn

REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN
EINER DESOXYRIBONUCLEASE
AUS DEM MEERESSCHWAMM
VERONGIA AEROPHOBA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Hans-Ulrich Diener
aus Leipzig

Mainz 1968



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546210_0102



REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN
EINER DESOXYRIBONUCLEASE
AUS DEM MEERESSCHWAMM
VERONGIA AEROPHOBA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Hans-Ulrich Diener
aus Leipzig

Mainz 1968

REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN
EINER DESOXYRIBONUCLEASE
AUS DEM MEERESCHWAMM
VERONGIA AEROPHORA

Dekan: Prof. Dr. Dr. G. Thews

Referent: Prof. Dr. R. K. Zahn

Tag der mündl. Prüfung: 22. 6. 1968

vorgelegt von

Hans-Ulrich Dierker

aus Leipzig

Gliederung:

I. EINLEITUNG

1. Aufgabenstellung
2. Desoxyribonuclease-Enzyme:
 - a) Abgrenzung
 - b) Einteilung
 - c) Entdeckung, Vorkommen, Inhibitoren, intrazelluläre Verteilung
 - d) Substrat, Reaktionsprodukte, Aktivierung durch Ionen
 - e) Biologische Rolle
 - f) Anwendung in der Medizin

II. MATERIAL und METHODEN

1. Ausgangsmaterial
2. Bestimmung von DNase-Aktivitäten
3. Proteinbestimmung
4. Herstellung einer Substratverdünnungsreihe zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten
5. Herstellung einer hitzedenaturierten DNA
6. Bestimmung von RNase-Aktivitäten
7. Bestimmung von Phosphodiesterase-Aktivitäten
8. Bestimmung alkalischer Phosphatase-Aktivitäten
9. Bestimmung saurer Phosphatase-Aktivitäten
10. Disc-Elektrophorese

III. PRÄPARATION DER DESOXYRIBONUCLEASE

1. Übersicht über das Reinigungsverfahren
2. Die Reinigungsschritte im Einzelnen

IV. ERGEBNISSE

1. Darstellungsverfahren
2. Eigenschaften der Desoxyribonuclease
 - a) Einheitlichkeit des Enzyms
 - b) Verunreinigung durch andere Enzyme

- c) pH-Optimum
- d) Aktivierung durch Ionen
- e) Abbaubarkeit hitzedenaturierter DNA
- f) Temperaturabhängigkeit der Reaktion
- g) Nachweis der Endonuclease-Wirkung
- h) Michaeliskonstante des Enzyms

V. DISKUSSION

- 1. Meßmethodik
- 2. Darstellungsverfahren
- 3. Enzymeigenschaften

VI. ZUSAMMENFASSUNG

VII. LITERATUR

VIII. LEBENSLAUF

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

DNA = Desoxyribonucleinsäure; RNA = Ribonucleinsäure;
DNase = Desoxyribonuclease; RNase = Ribonuclease; EDTA =
Äthylendiamin-tetraacetat, Dinatriumsalz; Bis = Bis-
methylenacrylamid; Temed = Tetramethyläthylendiamin; Tris-
Puffer = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl-Puffer; DEAE-
= Diäthylaminoäthyl-; CM- = Carboxymethyl-.

I. EINLEITUNG

1. Aufgabenstellung

Die Spongien oder Schwämme sind die weitaus am einfachsten organisierten Metazoen. Insbesondere unterscheiden sie sich von allen anderen Stämmen dadurch, daß bei ihnen keine Sinnes-, Nerven- und Muskelgewebe differenziert sind. Versuche, die Desoxyribonucleinsäure dieser primitivsten Gewebetierchen darzustellen, scheiterten wie weitere Untersuchungen zeigten an Desoxyribonucleasen, die trotz der üblichen Hemmittel (Hitze, Detergens, Phenol, Äthylendi-aminotetraacetat) die DNA vor ihrer Isolierung abgebaut hatten. Die Stabilität der Enzyme gegenüber diesen Maßnahmen und ihre relativ hohe Konzentration im Schwammgewebe ließen Reinigung und Charakterisierung einer solchen Desoxyribonuclease aussichtsreich erscheinen. Bei *Verongia aerophoba* trafen massenhaftes Vorkommen und hohe, kaum hemmbare DNase-Aktivitäten zusammen, sodaß dieser Hornschwamm als Enzymquelle ausgewählt wurde.

2. Desoxyribonuclease-Enzyme

Zuvor soll jedoch ein kurzer Überblick über die in tierischen Geweben vorkommenden DNase-Enzyme (ausführliche Darstellungen bei (1), (2) u. (3)) gegeben und ihre mögliche biologische Rolle diskutiert werden. Ferner wird über die Anwendung von DNasen in der Medizin berichtet.

a) Abgrenzung (1)

Desoxyribonucleasen greifen Internucleotidbindungen in Desoxyribonucleinsäuren an und sind damit, zusammen mit den Exonucleasen und den Ribonucleasen, eine spezielle Untergruppe der Phosphodiesterasen.

Im Unterschied zu den Phosphodiesterasen (Exonucleasen) werden nur Polynucleotide und Oligonucleotide der Desoxyribosereihe angegriffen. Substanzen von Nicht-Nucleotid-Charakter, wie z. B. Bis-p-nitrophenylphosphat, werden nicht hydrolysiert. Es liegt eine reine Endonuclease-Wir-

kung vor, da terminal stehende Mononucleotide nicht abgespalten werden.

Im Unterschied zu den Ribonucleasen besteht eine absolute und nur in Ausnahmefällen (Mikrokokken-Nuclease (4), EC 3.1.4.7 und Azotobacter-Nuclease (5), EC 3.1.4.9) durchbrochene Spezifität für den Nucleinsäure-Baustein Desoxyribose, mit allen Konsequenzen hinsichtlich des bei DNasen rein hydrolytischen Reaktionsmechanismus, da ein Hydroxyl an C-2' für eine Transfer-Reaktion nicht verfügbar ist.

b) Einteilung (6)

Entsprechend den Empfehlungen der "Commission on Enzymes" werden Desoxyribonucleasen aufgrund ihrer Reaktionsprodukte in 5'-Monoester-Bildner (Desoxyribonucleat-Oligonucleotido-Hydrolase, EC 3.1.4.5) und 3'-Monoester-Bildner (Desoxyribonucleat-3'-Nucleotido-Hydrolase, EC 3.1.4.6) unterteilt. Beide Typen von Enzymen scheinen streng getrennt zu sein mit einer absoluten Spezifität zu jeweils der einen oder der anderen Seite der Internucleotid-Bindung.

Seit Jahren gebräuchlich ist die Unterteilung nach den optimalen Reaktionsbedingungen in neutrale- oder DNase-I-Enzyme (5'-monoesterbildend, pH-Optimum 7 - 7,5) und saure- oder DNase-II-Enzyme (3'-monoesterbildend, pH-Optimum 4,2 - 5,5). Beide Klassen wurden von LASKOWSKI (2) eingeführt, um DNasen verschiedener Zellen mit ihren Prototypen, der Pankreas-DNase-I von KUNITZ (7) und der Thymus-DNase-II von MAVER u. GRECO (8) vergleichen zu können. In dieser für tierische Gewebe gültigen Einteilung lassen sich jedoch nicht alle mikrobiellen DNasen unterbringen.

c) Entdeckung, Vorkommen, Inhibitoren, intrazelluläre Verteilung

Die erste Beschreibung von katalytischen Effekten, die der DNase-Wirkung zuzuschreiben waren, gehen auf ARAKI (9) und SACHS (10) zurück, die Pankreaspräparate untersuchten. Es ist das Verdienst von KUNITZ (11) erstmals eine DNase

(aus Rinder-Pankreas) kristallin dargestellt zu haben. Pankreasgewebe ist überhaupt die beste Quelle für DNase-I; das Enzym erfüllt nach Abgabe in den Dünndarm Verdauungsfunktion (12) und ist im Pankreassaft des Rindes zu rund 1 % der sezernierten Proteine enthalten (13). Daher stellten ALLFREY u. MIRSKY (14), nachdem die saure DNase (Milz (15), Thymus (8)) entdeckt worden war, die Hypothese auf, daß DNase-I pankreasspezifisch sei, in anderen Zellen nicht vorkäme und diese nur DNase-II besäßen. Bald sammelten sich aber eine ganze Zahl von Hinweisen an, daß ein und dieselbe Zelle mehr als nur einen Typ von DNasen besitzt (16,17,18). Offenbar sind beide Desoxyribonucleasen Enzyme von ubiquitärem Vorkommen.

Die Unklarheiten über die Verbreitung neutraler DNasen rührten zum Teil von der Existenz wirksamer Inhibitoren (19) her. Sie sind für zahlreiche Gewebe beschrieben worden: Leber (20), Lunge (21), Niere (20), Herz (21), Gehirn (20), Milz (20), Hoden (20), Darm (20) und Kropfdrüse der Taube (22). Bekannt ist der Inhibitorgehalt der Leukozyten (23, 24,25), seine physiologische Bedeutung ist unklar. Alle bisher untersuchten Inhibitoren (20,22,25) sind leicht lösliche Proteine, sie passieren Dialysemembranen nicht, sind hitzelabil, werden durch Proteasen wie Trypsin inaktiviert und durch Ansäuern zerstört. Beim Aufbewahren von Gewebs-extrakten sind sie labiler als die DNase (26), es resultiert ein Aktivitätsanstieg. Diese beschriebenen Inhibitoren sind gegen DNase-I aus Pankreas und die mit Pankreas-DNasen zumindest eng verwandten Serum-Nucleasen gerichtet ohne Kreuzreaktionen mit Enzymen anderer Herkunft oder anderen Wirkungstyps zu zeigen. Nur für den Leukozyten-Hemmstoff ist Proportionalität zwischen Hemmwirkung und Inhibitorkonzentration nachgewiesen (23). Spezifische Inhibitorproteine gegen DNase-II sind bisher nicht nachgewiesen.

Trotz des Wissens um Desoxyribonuclease-Inhibitoren sind DNase-I-Enzyme aus Geweben nur mangelhaft charakterisiert; außer für Pankreasgewebe existieren keine Reinigungsverfahren für DNase-I. Dabei wäre das Verhalten von Pankreas-

DNase-I zu Gewebs-DNase-I in Analogie zu den Endopeptidasen zu denken, wie das von Chymotrypsin und Trypsin als sekretorischen - zu Kathepsin als zelleigenem Ferment.

Für DNase-II-Enzyme dagegen existieren Verfahren zur Isolierung aus Thymus (8), Milz (15,92) und Lachshoden (32), die mit 100 - 1000facher Anreicherung bei 2 - 20 % Ausbeute arbeiten.

In der Frage der intrazellulären Verteilung von DNasen besteht für DNase-II Einigkeit darüber, daß die Hauptmenge des Enzyms in den Lysosomen lokalisiert ist (27).

Im Pankreasgewebe lokalisiert sich DNase-I in den Zymogengranula (13); für Rattenleber (16) und Schweineniere (26) weist SIEBERT beträchtliche Aktivitäten im Zellkern nach. SHACK (28) gibt generell Partikelbindung in Mäusegeweben an und BEAUFAY (29) lokalisiert das Enzym in der Rattenleber in die Mitochondrien. Die Frage, ob DNase-I eine einheitliche Verteilung zeigt oder in mehr als einer Zellfraktion angetroffen wird, ist demnach offen.

d) Substrat, Reaktionsprodukte, Aktivierung durch Ionen

Pankreas-DNase-I (30) baut ebenso wie DNase-II (Milz (31), Lachshoden (32)) denaturierte DNA schlechter ab als native (zweistrangige) DNA. Auch hier bilden einige mikrobielle DNasen eine Ausnahme (33), die denaturierte DNA 20 - 100 mal schneller abbauen.

Wird ein Teil der Purinbasen aus der DNA entfernt, so werden diese sogenannten Apurinsäuren unabbaubar durch DNase-I (34,35) und DNase-II (32).

Ebenso scheint glucosylierte Virus-DNA gegen DNase-I weitgehend resistent zu sein (36).

Die Basenspezifität der DNasen ist entgegen früheren Vermutungen (2) über suszeptile und resistente Bindungen wenig ausgeprägt (37). Wie aus der Natur einer Endonuclease-Wirkung zu fordern ist, dienen die Produkte früher Reaktionsstadien in späteren als Substrat, sodaß sich die Zusammensetzung des Substrats mit fortschreitender Hydrolyse ständig ändert. Damit geht, jemehr man sich dem Ende der

Reaktion nähert, eine laufende Verschiebung der Basenspezifität einher. Diese kann daher nur für jeweils ein Stadium des DNA-Abbaus mit einiger Schärfe formuliert werden. Unter den Bedingungen der erschöpfenden Hydrolyse bildet DNase-I 2 % Mono-, 63 % Di- und 25 % Trinucleotide (38). Im Vergleich dazu enthält das Hydrolysat nach DNase-II-Verdauung mehr Mononucleotide (7,3 %), weniger Di- (3,3 %) und Trinucleotide (5,5 %), sowie mehr Oligonucleotide (39). Das Oligonucleotidgemisch nach DNase-II-Hydrolyse ist durch DNase-I weiter abbaubar, was umgekehrt nicht gilt (40). Seit den ersten Beschreibungen von DNase-I aus Rinderpankreas ist bekannt, daß Magnesium-Ionen zur Aktivität benötigt werden (20), dem entspricht die Hemmbarkeit durch Citrat (19), das jedoch besser durch Äthylendiamintetraacetat (41) ersetzt wird. Die optimale Magnesium-Ionenkonzentration hängt von der vorgegebenen Menge DNA ab (11); nach MIYAJI u. GREENSTEIN (42) soll das molare Verhältnis von Mg^{++} zum Gesamtphosphor des Substrats 3 : 1 betragen, was weit mehr ist als dem stöchiometrisch gebundenen Metall entspricht (43). WIBERG (43) zeigte, daß Mangan (Mn^{++}) ein besserer Aktivator als Magnesium ist; er wies auch auf die starke synergistische Wirkung von Mg^{++} und Ca^{++} hin. Nach DESREUX, HACHA u. FRÉDÉRICQ (44) soll Mg^{++} den Angriff des Enzyms an der makromolekularen DNA, Ca^{++} dagegen den Angriff von Oligonucleotiden bevorzugt aktivieren. Die ursprüngliche Annahme, daß DNase-II-Enzyme keine zweiwertigen Ionen benötigen, ist unrichtig und beruht wohl darauf, daß das Substrat fast immer (unbekannte) Mengen dieser Ionen enthält (44,45). Mit ansteigender Ionenstärke nimmt die Aktivität der Pankreas-DNase-I ab, unabhängig davon, ob die Ionenstärke durch Na^+ oder Mg^{++} eingestellt wird (11); so beträgt sie bei einer Ionenstärke von 0,10 nur noch 50 % und bei 0,16 noch 20 % gegenüber 100 % bei 0,04. Im Gegensatz dazu benötigt DNase-II relativ hohe Ionenstärken für maximale Wirksamkeit. So wird eine Ionenstärke von 0,25 M KCl bzw. für das Enzym aus Lachshoden von 0,3 M Acetat (32) angegeben.

e) Biologische Rolle von DNasen

Die biologische Rolle von DNasen ist unbekannt, dabei stellen gerade biologische Verfahren die empfindlichsten Meßmethoden für DNasen überhaupt dar. So verfolgen CONOLLY u. Mitarbeiter (46) den Verlust transformierender Aktivität einer DNA mit Transformationseigenschaften für Streptomycinresistenz aus *Haemophilus influenzae* unter DNase-Einwirkung. Dabei zerstören 1×10^{-9} g kristallisierter Pancreas-DNase 1×10^{-6} g transformierender DNA in 6 min. zu 90 %. YOUNG u. SINSHEIMER (47), die mit biologisch aktiver DNA aus lambda-Phagen die Kinetik der ersten Schritte der DNase/DNA-Reaktion untersuchten, stellten fest, daß im Mittel nur vier Phosphodiesterbindungen hydrolysiert werden (Einzelstrang-Schnitte) bevor die Infektiosität verloren geht (Doppelstrang-Schnitt oder Bruch). Demnach genügen Spuren von DNase um die Wirkung biologisch aktiver DNA zu zerstören.

Könnte dann nicht die Bedeutung von DNasen in der Kontrolle biologisch aktiver, art- und/oder positionsfremder DNA liegen? Diese These ist durch weitere Experimente gestützt worden: ITO u. EVANS (48) sowie HODES u. Mitarb. (49) konnten bei Experimenten mit dem " Shope-papilloma-virus " des Kaninchens die tumorerzeugende Aktivität der Virus-DNA mit DNase zerstören. BORENFREUND u. BENDICH (50) zeigten, daß DNA oder deren Abbauprodukte, die von HeLa-Zellen aufgenommen wurden und sich in der Kernregion lokalisierten, quantitativ durch DNase entfernt werden können. HERRIOTT et al. (51,52) diskutieren das feine Zusammenspiel, welches zwischen Virus-DNA, ihrer Zerstörung durch Serum-Nucleasen und der Infektion der Zelle bestehen könnte. Auch die schon früher von ZAHN u. Mitarbeitern (53) beschriebene reaktive DNase-Aktivitätssteigerung nach parenteraler DNA-Gabe könnte Ausdruck einer solchen "Polizeifunktion" der DNasen sein.

Damit kaum vereinbar erschienen Befunde (54), wonach DNase-Applikation eine Steigerung der zellulären Teilungsrate, besonders bei befruchteten Eiern, hervorrief. Diese teilungs-

beschleunigende Wirkung schien ganz allgemein zu sein, wie ZAHN u. Mitarb. (55,56) bei den verschiedensten Organismen und Zellen in Kultur nachweisen konnten. Da, besonders bei dotterreichen Eiern, größere Mengen feulgenpositiven Materials im Dotter liegen, könnte man annehmen, daß die Hydrolyse dieser "Reserve-DNA" durch DNasen Bausteine zur Synthese nucleärer, aktiver DNA liefert. Dann sollte aber DNA-Zusatz zu sich unter DNase-Einfluß rascher teilenden Zellen oder, um die DNase-Wirkung vorwegzunehmen, der Zusatz von Nucleotiden ebenfalls teilungsbeschleunigend wirken. Das ist jedoch, wie KIEFER u. ZAHN (57) zeigen konnten, nicht der Fall: DNA-Zusatz hemmt und Nucleotid-Zusatz bleibt ohne Wirkung.

DNase-Zusatz führt demnach ohne Umweg über rasch diffusible Reaktionsprodukte zu einer Steigerung der Mitoserate. Gilt nun auch umgekehrt, daß Zellen, die sich unter irgendeinem Reiz (z.B. einem Regenerationsreiz) rascher teilen, einen höheren DNase-Spiegel aufweisen als im Normalzustand? Hier lieferten die Untersuchungen über die Leberregeneration der Ratte eindrucksvolle Befunde: BRODY u. THORELL (58) und BRODY (59) konnten bereits einige Stunden nach partieller Hepatektomie der Ratte stark erhöhte Nuclease-Werte in diesem Organ messen, die von einer Erhöhung der Mitoserate gefolgt werden (FRIEDRICH-FRESKA u. ZAKI (60)). Eine weitere Stütze erfährt die Verknüpfung von DNase-Enzymen und Zellteilung durch eine Arbeit von STERN (61), in der die periodische Induktion von DNase-Aktivitäten in Beziehung zum Mitosezyklus nachgewiesen werden konnte.

Auf der anderen Seite wies KURNICK (62) darauf hin, daß die Rolle der DNasen katabol ist. Es konnte unter bestimmten Bedingungen gezeigt werden, daß sie die Protein-Synthese durch Zerstörung der notwendigen DNA verhindern (63,64). Von diesem Standpunkt aus müßte erwartet werden, daß proliferierende Zellen weniger Enzym besitzen. Dies könnte bei Krebs-Zellen der Fall sein, bei denen die Protein-Syntheserate ebenso hoch liegt wie bei wachsenden embryonalen Zellen. Tatsächlich konnten nun DAOUST et al. (65,66) mit

einer speziellen histologischen Technik nachweisen, daß niedrige DNase-Aktivitäten Krebszellen charakterisieren können. Umgekehrt konnte DE LAMIRANDE (67) durch intra-peritoneale Injektion von DNase-I die Überlebenszeit von Mäusen mit Ehrlich-Aszites-Carcinom signifikant steigern. SUGIURA u. CREECH (68), die noch höhere Dosen an DNase einsetzen konnten, beobachteten sogar eine komplette Hemmung des Aszites. Katabolismus und Wachstumsheftung treten jedoch erst bei Dosierungen auf, die 100 - 1000fach über den wachstumsfördernden und somit in einem Bereich unphysiologisch hoher Konzentrationen liegen. Solche Befunde können daher zur Deutung der DNase-Funktion in der Zelle nicht herangezogen werden.

Ein ganz neuer Zugang zum Verständnis der Rolle von DNasen bei der DNA-Synthese wurde durch Untersuchungen mit Desoxyribotid-Polymerasen eröffnet. Polymerasen, die vollziehen die Biosynthese der DNA, benötigen außer den Triphosphaten aller vier Nucleoside noch eine kleine Menge Desoxyribonucleinsäure, die als Starter für die Reaktion dient. Für einige hochgereinigte Fraktionen der E. coli-Polymerase (69) ist jedoch native DNA, im Gegensatz zu hitzedenaturierter, nur ein schlechter Starter. LEHMANN (70) konnte nun zeigen, daß Kalbs-Thymus-DNA zum Primer wird, der 2 - 3 mal höhere Syntheseraten liefert, wenn man minimale Mengen Pankreas-DNase-I einwirken läßt. Es ist möglich, daß durch die Behandlung mit DNase-I mehr freie 3'-Hydroxylgruppen zur Kondensation mit den Desoxynucleosid-Triphosphaten zur Verfügung stehen. Die Notwendigkeit von DNasen zur DNA-Synthese durch Polymerasen kann jedoch auch im Zusammenhang mit dem Vorkommen ringförmiger, nativer DNA (71,72) gesehen werden. Diese Form der DNA ist möglicherweise nicht in der Lage die DNA-Synthese durch Polymerasen zu erlauben. Dazu bedarf es des Aufbrechens der Ringe oder zumindest eines Ringes. Diese Funktion käme den DNasen zu; vom 3'-OH-Ende kann dann die Analog-Synthese beginnen. So gesehen bestünde die Rolle der DNasen in der Bildung eines Primers für die DNA-Synthese, sie müßten demnach als "primer-forming-enzymes" charakteri-

siert werden.

Jedenfalls haben solche Vorstellungen weitere Untersuchungen ausgelöst. ZAHN (73) konnte an sich entwickelnden Seeigel-eiern zeigen, daß die DNA-Synthese-Geschwindigkeit jedesmal, wenn ein DNase-Aktivitätsmaximum erreicht wird, eine Steigerung erfährt.

Bislang war es, der mangelnden Spezifität wegen, nicht möglich DNase-Hemmeffekte zur Klärung der biologischen Rolle dieser Enzyme heranzuziehen. Die zufällige Beobachtung (74), daß DNA durch Behandlung mit einer hochtourigen Metallturbinen in eine durch DNasen nicht mehr abbaubare Form übergeht, führte schließlich zur Herstellung modifizierter (strang-vernetzter) DNA mit stabilen Hemmeigenschaften (ZAHN (75)). Nach Zugabe solcher modifizierter DNA zu Zellen in Kultur treten offenbar keine weiteren Zellteilungen mehr auf. Auch beim Ehrlich-Aszites-Tumor der Maus reduziert die Injektion modifizierter DNA die Vermehrung des Tumors drastisch. Möglicherweise werden sogar alle Tumorzellen abgetötet (75). Aber nur solche DNA, die sich auch im DNase-Test als unabbaubar erweist, vermag diese Hemmung auszuüben. Der Stillstand der Zellvermehrung könnte demnach bedeuten, daß DNasen für die Zellvermehrung erforderlich wären. Der hier naheliegende Schluß, daß DNasen über die DNA-Vermehrung (Bildung eines Starters) die Zellteilung ermöglichen, wird jedoch durch weitere Versuche erhärtet werden müssen.

f) Anwendung von DNasen in der Medizin

Als Pharmakon kann DNase überall dort zur Anwendung kommen wo Ansammlungen hochviskösen Materials vorliegen. Ihre verflüssigende Wirkung macht solche Massen der Drainage bzw. Aspiration zugänglich; zugleich wird der vollständige Abbau durch zelleigene Enzyme möglich, denn Dephosphorylierung und Nucleosidspaltung finden nicht am hochmolekularen Substrat statt. Da es sich in den meisten Fällen um fibrinopurulente Exsudate handelt, die in typischer Weise aus Fibringerinnseln und nekrotischen Leukozyten zusammengesetzt sind, findet die Streptokokken-DNase (= Streptodornase) kom-

biniert mit Streptokinase Anwendung.

So ist diese Kombination in Form von Aerosolen zur Verflüssigung von Schleim und Eiter in den Bronchien herangezogen worden (76).

Auch bei der Behandlung von traumatischen und infektiösen Oberflächendefekten hat sie sich bewährt, um die Wunde zu säubern und eine bessere Penetration der Antibiotika zu ermöglichen (77).

Ferner sind Streptodornase und -kinase zur Instillation in Fistelgänge (78) und zur zusätzlichen Behandlung von Abszessen (79) verwendet worden.

Am erfolgreichsten wird diese Kombination jedoch bei Pleuraergüssen der verschiedensten Ätiologie angewandt (80). Es gelingt heute, besonders bei Pyo- und Hämatothorax, solche Ergüsse enzymatisch auszuräumen. Beim Hämatothorax (81) ist in allen Fällen, in denen rasche Koagulation und entzündliche Reaktion zu einer Fixierung und Adhäsion führen und damit weitere Aspiration unmöglich machen, der Versuch mit Streptodornase und -kinase indiziert. Setzt die Therapie nur zeitig genug ein, so kann die Entfernung des Koagulums, die früher nur chirurgisch möglich war, durch die enzymatische Ausräumung ersetzt werden.

Auch als Adjuvans zur Behandlung von Meningitiden (82,83) ist die Kombination Streptodornase/-kinase herangezogen worden. Ihre theoretische Indikation leitet sich her, einmal zur Auflösung des Fibrins und damit einer besseren Exposition der Bakterien gegen die Antibiotika und zur Verhinderung eines subarachnoidalen Blocks. Es darf jedoch kein Zweifel daran bestehen, daß nur frühzeitige, massive und spezifische antibiotische Therapie die Prognose bestimmt. Immerhin konnten sich JOHNSON et al. (84) vom Nutzen einer solch zusätzlichen Therapie mit DNase überzeugen.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Ausgangsmaterial

Für den verwendeten Schwamm ergibt sich bei absteigend analysierendem Bestimmungsgang (RIEDEL (85)) die folgende Klassifizierung:

Stamm: Porifera (Spongiaria)

Klasse: Demospongiae

Ordnung: Keratosae

Familie: Spongiidae

Gattung: *Verongia aerophoba*

Verongia aerophoba kommt in 2-10 m Tiefe, besonders zwischen *Zostera* und Sand steiniger Gründe, massenhaft und bis zu 60 cm groß wachsend vor. Der Schwamm weist dicke, 3-6 cm lange und 1-2 cm starke, oben abgeflacht vertiefte und je ein Osculum tragende Schlote auf, ist lebhaft gelb gefärbt und wird an der Luft rasch schwarz (*aerophoba*).

Dieses Nachdunkeln muß darauf zurückgeführt werden, daß aromatische Bestandteile in dunkle Pigmente überführt werden, wenn sie mit Sauerstoff in Berührung kommen. An diesem Vorgang sind Phenoloxidasen beteiligt. Unter ihrer Wirkung werden Phenole unter Chinonbildung oxydiert und dann in einer Reihe von Folgereaktionen, die zum Teil spontan ablaufen, in Melanine umgewandelt. Der offenbar sehr aktive Phenolase-Komplex von *Verongia aerophoba* erklärt gleichzeitig die Unwirksamkeit von Phenol und seinen Derivaten als DNase-Hemmstoff bei der DNA-Darstellung.

Die Schwämme wurden in der Bucht von Rovinj (Istrien, Jugoslawien) aus 2-6 m Tiefe gewonnen, sofort gesäubert, zerkleinert und an der Luft getrocknet. Der so erhaltene Trockenschwamm diente als Ausgangsmaterial für die Enzympräparation.

2. Bestimmung von DNase-Aktivitäten

Bei allen Bestimmungen diente Desoxyribonucleinsäure aus Herings-Testes (Fa. Mack, Illertissen) als Substrat. Die DNA wurde nach Suspension in der jeweiligen Lösung mit Glasperlen geschüttelt um größere Klumpen aufzubrechen.

a) Viskosimetrische Bestimmung (19,20)

Prinzip: Der durch enzymatischen Abbau bedingte Abfall der Viskosität einer DNA-Lsg. wird gemessen und dient als Maß für die Enzymaktivität.

Gerät: Rotationsviskosimeter der Fa. Brookfield Eng. Labs., Stoughton, Mass., U.S.A.- Daten: Schergradient von 64 sec^{-1} ; Meßbereich 0-10 centipoises; Meßgenauigkeit: $\pm 0,2$ centipoises; Meßvolumen: 25 ml. Der Meßbecher war thermostatisiert.

Reagentien: 1. DNA-Lsg. 1,5 mg/ml 0,05 M Tris pH 7,6;
2. 1 M MgCl_2 .

Vorgehen: Es werden 24 ml der DNA-Lsg., sowie 0,5 ml des Aktivierungsgemisches in den Meßbecher gegeben und nach Angleich der Temperatur auf 25°C 0,5 ml der Enzym-Lsg. zugesetzt. Dann wird im Abstand von je einer Minute die Viskosität abgelesen.

Definition der Aktivitätseinheit (AE):

Unter einer Aktivitätseinheit verstehen wir die Menge Enzym, die die Einheit der Viskosität (in centipoises) in der Einheit der Zeit (in min.) um eins erniedrigt; also $1 \text{ AE} = 1 \text{ cp/min.}$

Da keine strikte Proportionalität zu Zeit und Enzymmenge in größeren Bereichen erwartet werden kann, wurden nur solche Meßpunkte berücksichtigt, deren Viskosität noch mindestens 50 % der Ausgangsviskosität betrug.

b) Messung am Titrierautomaten (74,86)

Diese Methode wurde zur Bestimmung des pH-Optimums herangezogen.

Prinzip: DNasen katalysieren die Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen, dabei kommt es zur Freilegung von Gruppen, die H-Ionen abdissoziieren, die sich dann durch NaOH zurücktitrieren lassen. Dabei ist der Laugenverbrauch der Anzahl der gespaltenen Phosphodiesterbindungen direkt proportional. Schaltet man einen Titrierautomaten als pH-Stat (74), so kann aus dem gegen die Zeit aufgetragenen Laugenverbrauch in einfacher Weise die DNase-Aktivität in μMol

gespaltener Phosphodiesterbindungen pro Zeiteinheit bestimmt werden.

Gerät: Titrierautomat der Fa. Radiometer, Kopenhagen. Einstellung: Papiervorschub: 10 mm/min.; Feder- und Kolbenvorschub: 60 %/min., 100 % entsprechen 0,5 ml einer 0,005 N NaOH-Lsg.- Die Titration wurde unter einer Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Die Temperatur betrug 25°C.

Reagentien: 1. 0,005 N NaOH;
2. DNA: $2,5 \times 10^{-3}$ g/ml 0,15 M NaCl;
3. Mg^{++} : 10^{-1} M $MgCl_2$.

Ausführung: Zunächst läßt man 4 ml der DNA-Lsg. auf das gewählte pH titrieren bevor 2 ml des gereinigten Enzyms (0,1 AE pro ml) zugesetzt werden, die ebenfalls auf das pH eingestellt werden. Erst die Protonenproduktion nach Zugabe von 0,2 ml des Aktivierungsgemisches wird ausgewertet.

c) Messung des Zuwachses an säurelöslichen Spaltprodukten
mit der Lanthannitrat-Methode (74)

Mit dieser Methode wurde die Aktivierung durch Ionen untersucht.

Prinzip: Die unter Enzym-Wirkung entstandenen säurelöslichen Spaltprodukte werden, nachdem nicht abgebaute Oligonucleotide durch angesäuerte Lanthannitrat-Lsg. entfernt sind, an Hand ihrer Absorption bei 260 nm erfaßt.

Reagentien: 1. DNA-: 2,5 mg/ml 0,01 M Tris-Puffer, pH 7,6;
2. Verongia-DNase: 0,1 AE/ml;
3. 0,05 M $La(NO_3)_3$ in 0,05 M HCL gelöst.

Ausführung: In einem Wasserbad von 37°C wird eine Reihe von Zentrifugengläsern aufgestellt, in die pipettiert werden:

1. 0,9 ml DNA-Lsg.;
2. 1,0 ml Aqua dest. (Standard) bzw.
1,0 ml Elektrolyt-Lsg. bestimmter Normalität (Test);
3. 0,1 ml DNase (0,1 AE/ml).

Die Röhrchen werden 2 Stunden bei 37°C inkubiert und danach mit je 4 ml angesäuerter Lanthannitrat-Lsg. versetzt. Die Röhrchen bleiben 20 min. stehen und werden anschließend bei ca. 2000 g 10 min. zentrifugiert. Dem Überstand werden 4 ml

zur Messung der UV-Extinktion gegen eine mit Tris-Puffer 2:1 verdünnte $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ -Lsg. entnommen.

d) DNase-Nachweis mit DNA-Agar-Platten (Plattentest) (87,88)

Der Plattentest diente zur Auffindung von DNase-Aktivitäten bei der Fraktionierung an Ionenaustauschern.

Prinzip: Unter DNase-Wirkung wird DNA so verändert, daß sie mit Säure nicht mehr fällbar ist. Wird DNA in ein festes Trägermedium eingebracht, so wird intakte DNA durch Säure-Zusatz präzipitiert (grau-weißer Niederschlag), während abgebaute Stellen optisch leer erscheinen.

Reagentien: 1. Agar-Agar 2 %;

2. DNA 1,5 mg/ml 0,1 M Tris-Puffer, pH 7,6;

3. Mg^{++} : 1 M MgCl_2 .

Herstellung der Platten: Agar-Agar-Lsg. wird 30 min. gekocht, über ein Faltenfilter filtriert und auf 50°C gekühlt (Lsg. I). Aus 10 Teilen DNA und 1 Teil Mg^{++} wird Lsg. II hergestellt und in einem Wasserbad auf 45°C erhitzt. Nun werden unter ständigem Rühren gleiche Teile von Lsg. I zu Lsg. II gegeben und rasch je 8 ml dieses flüssigen DNA-Agars in horizontal stehende, vorgewärmte Petrischalen pipettiert. Die Schalen werden sofort bedeckt und bleiben bis zum Erstarren des Agars stehen.

Test: Aus Filtrierpapier werden Blättchen von ca. 5 mm Durchmesser gestanzt, mit je 10 µl Testlsg. getränkt und auf den Agar gelegt. Nach 2-24stündiger Inkubation bei 37°C wird mit 5 ml einer 0,1 M HCl-Lsg. überschichtet und abgelesen. DNase-Aktivitäten verraten sich als Löcher im präzipitierten DNA-Rasen.

3. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm bestimmt (11): $E_{280\text{nm}} \times 0,9 = \text{mg Protein/ml}$.

Definition der spezifischen Aktivität: Die spezifische Aktivität wurde als Quotient der viskosimetrisch gemessenen Enzymaktivität (in AE/ml) und dem Proteingehalt (in mg/ml) ausgedrückt; also spezif. Aktivität = AE/mg Protein.

4. Herstellung einer Substratverdünnungsreihe zur Bestimmung der Michaelis-Konstanten (74)

Da sich aus der hohen Viskosität der verwendeten DNA Schwierigkeiten der Dosierung bei der Herstellung der Substrat-Verdünnungsreihe ergeben, wurde eine besondere Spritze (74) benutzt. Diese ist mit einem unteren und oberen einstellbaren Anschlag versehen, so daß der Spritzenkolben eine genau festlegbare Volumenverschiebung bewirkt. Im Spritzenzylinder befinden sich Glasperlen bekannten Volumens, die für gute Durchmischung des Zylinderinhalts sorgen. Bei der Herstellung der Substratverdünnungsreihe taucht man die Spritze bei vorgerücktem Kolben zunächst in die konzentrierte Ausgangslösung (5×10^{-3} g DNA/ml Trispuffer 0,05 M pH 7,6) und läßt ihn zurückgleiten. Dabei werden in den 2 ml fassenden Zylinder 0,3 ml aufgenommen. Nun wird die Spritze senkrecht gestellt, bis die visköse DNA-Lsg. sich abgesetzt hat, dann wird der Spritzenkolben wieder vorgeschoben, erneut eingetaucht usw., bis der Zylinder gefüllt ist.

In das erste Zentrifugenröhrchen (Wasserbad von 37°C) werden mit der Spritze 0,3 ml der konzentrierten DNA-Lsg. gegeben. Die Verdünnung in den nächsten Röhrchen erfolgt wie für die konzentrierte DNA-Lsg. beschrieben, nur wird aus einer 0,05 M Trispufferlösung pH 7,6 aufgesaugt und - nach Durchmischung - in das nächstfolgende Röhrchen ausgespritzt. Auf diese Weise wird eine Substrat-Verdünnungsreihe nach dem Volumenersatzprinzip (89) hergestellt. In halblogarithmischer Darstellung ergibt sich eine Gerade über einen Verdünnungsbereich von 1:20.

Die Bestimmungen werden als Doppelreihe angesetzt, wobei eine Reihe als Kontrolle dient. In der Kontrollreihe werden zu je 0,3 ml DNA-Lsg. pro Röhrchen je 0,7 ml des Aktivierungsgemisches (0,0715 M Mg^{++} und 0,00715 M Ca^{++}) zugegeben. Im Versuchsansatz enthält das Aktivierungsgemisch noch 0,05 AE Verongia-DNase.

Die DNase-Aktivität wird mit der Lanthanmethode (wie unter 2 c beschrieben) bestimmt.

5. Abbaubarkeit von hitzedenaturierter DNA (90)

Herstellung einer hitzedenaturierten DNA-Lsg.: 12 ml einer DNA-Lsg. (2,5 mg/ml 0,05 M Trispuffer pH 7,6) werden in ein dünnwandiges Reagensglas gegeben und in ein Wasserbad von 100°C verbracht. Die Probe wird 15 min. bei dieser Temperatur gehalten und anschließend im Eisbad auf 4°C gekühlt.

Ansatz: Es werden Doppelbestimmungen mit nativer DNA als Kontrolle angesetzt. In die in einem Wasserbad von 37°C stehenden Zentrifugenröhrchen werden pipettiert:

1. 1 ml DNA-Lsg.;
2. 0,7 ml Aktivierungsgemisch (0,15 M $MgCl_2$);
3. 0,3 ml Verongia-DNase (0,1 AE/ml).

Im Abstand von 15 min. werden je ein Röhrchen (Test und Kontrolle) entnommen und mit Lanthannitrat gefällt. Weiterbehandlung wie unter 2 c. Nach 45 min. wird eine Reihe des Kontrollansatzes dem Verfahren zur Hitzedenaturierung unterworfen und nach erneuter Zugabe von Enzym wieder in den Test eingesetzt.

6. Bestimmung von RNase-Aktivitäten

Die RNase-Bestimmung wurde nach der Vorschrift von KALNITSKY et al. (91) durchgeführt.

Prinzip: Die Hydrolyse von RNA wird bei pH 5,0 durch Messung des Anteils säurelöslicher Oligonucleotide bestimmt, die unter spezifischen Bedingungen gebildet werden.

Eine Einheit ist dem Anteil säurelöslicher Oligonucleotide äquivalent, der einen Anstieg der Absorption bei 260 nm von 1,0 bedingt.

Reagentien: 1. Enzym: RNase (kristallisiertes Produkt der Fa. Worthington, Freehold N.J., U.S.A.) in H_2O gelöst und mit 0,1 M Acetatpuffer pH 5,0 auf 1 µg/ml verdünnt.

2. Substrat: 0,5 % RNA (Fa. Worthington) in 0,1 M Acetatpuffer pH 5,0 gelöst.

3. Uranylacetat: 0,75 % in 25 % Perchlorsäure.

Ausführung: In Zentrifugenröhrchen, die in einem Wasserbad von 37°C stehen, werden in

Nr. 1 1 ml Acetatpuffer, 0,1 M pH 5,0 (Leerwert);

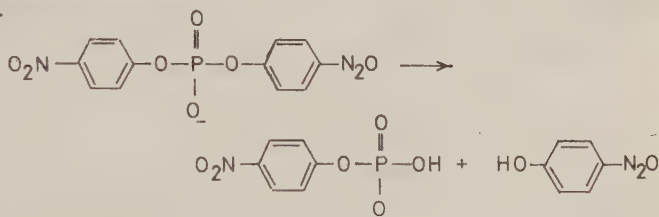
- Nr. 2 1 ml RNase (Kontrolle);
 Nr. 3 1 ml DNase-Extrakt (Test);
 Nr. 4 1 ml DNase, beste Fraktion (Test);

gegeben und zur Zeit t_0 je 1 ml Substrat zugesetzt. Nach 15 bzw. 30 min. Inkubation bei 37°C wurde 1 ml Uranylacetat zugesetzt, die Proben in ein Eisbad verbracht, in dem sie 10 min. stehen blieben, bevor 10 min. bei 2000 g zentrifugiert wurde. 0,1 ml des Überstandes wurden mit H_2O auf 3,0 ml verdünnt und die Absorption bei 260 nm gegen den Leerwert gemessen.

7. Bestimmung von Phosphodiesterase-Aktivitäten

KOERNER u. SINSHEIMER (92) benutzen Ca-bis(p-nitrophenyl)-phosphat als Substrat.

Prinzip:



Der durch Enzym-Wirkung bedingte Anstieg von p-Nitrophenol wird durch die Zunahme der Absorption bei 400 nm gemessen. 1 μM p-Nitrophenol/ml entspricht bei 400 nm 12,0 Extinktionseinheiten. Die Enzymaktivität wird in μM p-Nitrophenol pro Zeiteinheit angegeben.

Reagentien:

1. 0,001 M Ca-bis(p-nitrophenyl)phosphat in 0,001 M Ammoniumacetatpuffer pH 4,5;
2. 0,3 M Magnesiumacetat;
3. 0,1 M Tris-acetat-Puffer pH 8,8.

Aus diesen Stammlösungen wird die frische Substrat-Lsg. hergestellt, indem 10 ml Lsg. 1, 3 ml Lsg. 2, 10 ml Lsg. 3 und 6 ml H_2O zusammengegeben werden.

Enzym: Schlangengift-Phosphodiesterase (Fa. Worthington)
 1 mg/ml zum Test 1:10 mit H_2O verdünnt.

Ausführung: In Zentrifugenröhrchen, die in einem Wasserbad von 37°C stehen, gibt man je 2,9 ml Substratlsg.; dann in

Nr. 1 0,1 ml H₂O (Leerwert);

Nr. 2 0,1 ml Schlangengift-Phosphodiesterase (Kontrolle);

Nr. 3 0,1 ml DNase-Extrakt (Test);

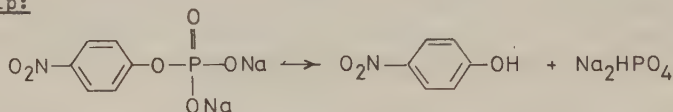
Nr. 4 0,1 ml DNase, beste Fraktion (Test).

Nach 60 bzw. 120 min. Inkubation bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von 3 ml einer 0,05 M NaOH gestoppt und anschließend die Extinktion bei 400 nm gegen den Leerwert gemessen.

8. Bestimmung alkalischer Phosphatase-Aktivitäten

In Anlehnung an die Methode von GAREN u. LEVINTHAL (93) wird di-Na-p-nitrophenylphosphat als Substrat benutzt.

Prinzip:



Die Freisetzung von p-Nitrophenol unter Phosphatase-Wirkung wird im Anstieg der Absorption bei 400 nm gemessen. Die Enzymaktivität wird in µMol p-Nitrophenol pro Zeiteinheit angegeben.

Reagentien:

1. 0,001 M p-Nitrophenylphosphat in H₂O;
2. 0,2 M Glycin-NaOH-Puffer pH 8,5;
3. 0,05 M MgCl₂.

Aus diesen Stammlösungen wird die frische Substrat-Lsg. hergestellt, indem 12 ml Lsg. 1, 10 ml Lsg. 2, 3 ml Lsg. 3 und 4 ml H₂O zusammengegeben werden.

Enzym: Alkalische Phosphatase (Chicken Intestine) der Fa. Worthington; 1 mg/ml, zum Test 1:10 mit H₂O verdünnt.

Ausführung: In Zentrifugenröhrchen, die in einem Wasserbad von 37°C stehen, gibt man je 2,9 ml Substratlsg.; dann in

Nr. 1 0,1 ml H₂O (Leerwert);

Nr. 2 0,1 ml alkalische Phosphatase (Kontrolle);

Nr. 3 0,1 ml DNase-Extrakt (Test);

Nr. 4 0,1 ml DNase, beste Fraktion (Test).

Nach 60 bzw. 120 min. Inkubation bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von 3 ml einer 0,05 M NaOH-Lsg. abgestoppt und anschließend die Extinktion bei 400 nm gegen den Leerwert gemessen.

9. Bestimmung saurer Phosphatase-Aktivitäten

Die Bestimmung gleicht der unter 8. für die alkalische Phosphatase beschriebenen, mit den Ausnahmen, daß Mg^{++} weglassen und der Glycin-Puffer durch einen 0,2 M Acetat-Puffer pH 5,0 ersetzt wurde (92). Im Kontrollansatz wurde saure Phosphatase (Wheat Germ) der Fa. Worthington, 1 mg/ml, zum Test 1 : 10 mit H_2O verdünnt, verwendet.

10. Disc-Elektrophorese

Die Disc-Elektrophorese wurde von ORNSTEIN u. DAVIS (94,95) zur analytischen Trennung von Proteingemischen entwickelt. Sie wurde hier angewendet, um die Einheitlichkeit der erhaltenen Enzympräparation zu prüfen.

Prinzip: Bei der Disc-Elektrophorese werden Proteine zunächst zu einer dünnen Startzone konzentriert und dann durch die Kombination von Elektrophorese und Molekülsieb nach Ladung und Molekülgröße getrennt.

Terminologie und Beschreibung: Die Disc-Elektrophorese wird in kleinen (7 x 0,5 cm) Säulen aus Polyacrylamid-Gel ausgeführt, die aus 3 Teilen bestehen: (1) einem großporigen Antikonvektions-Gel, in das die Proteinprobe einpolymerisiert ist (sample-gel); (2) einem großporigen Zwischengel, in dem die Probe elektrophoretisch konzentriert wird (spacer-gel) und (3) einem kleinporigen Trenngel (running-gel). Zwischen (2) und (3) besteht eine pH-Diskontinuität. Elektrodenfächer, Platinelektroden und ein Netzgerät vervollständigen die Ausrüstung.

Die notwendigen Ionenkomponenten werden als "leading-ion", "trailing-ion" und "buffer-counterion" bezeichnet. Das "leading-ion" hat die höchste, vom pH unabhängige Wanderungsgeschwindigkeit aller Komponenten. Das "trailing-ion", eine schwach ionisierte Spezies, meist eine Aminosäure, ist so

gewählt, daß es im "spacer-gel" langsamer wandert als das langsamste Protein, im pH des "running-gel" jedoch so stark dissoziiert ist, daß seine Wanderungsgeschwindigkeit der des "leading-ion" angeglichen wird.

Zu Beginn des Laufes (Fig. 1A) ist das "trailing-ion" in den beiden Elektrodenfächern, das "leading-ion" in "sample"-, "spacer"- und "running-gel" und der Puffer in allen Sektionen.

Während des Laufes (Fig. 1B) beobachtet man eine scharf begrenzte Scheibe, die vom oberen Ende des "sample-gel" herunterwandert. Die Analyse dieser Front zeigt, daß es sich dabei um die "leading/trailing-ion"-Grenze handelt. Sollte überdies die Probe gefärbt sein, so kann beobachtet werden, wie sie mitgeschleppt und in dieser Front konzentriert wird.

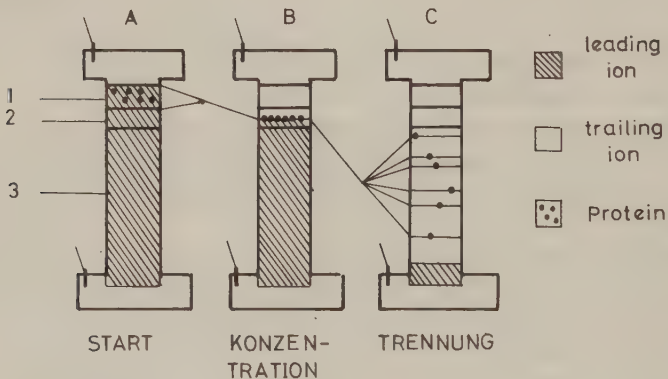


Fig.1: In der Disc-Elektrophorese wird das Proteingemisch zunächst in einer dünnen Startzone konzentriert, anschließend werden die Komponenten der Zone elektrophoretisch und nach Molekülgröße getrennt. In Anlehnung an ORNSTEIN (94).

Sobald die pH-Diskontinuität an der Grenze "spacer/running-gel" passiert ist bricht die Front auseinander (Fig. 1C). Die "leading/trailing-ion"-Grenze wandert weiter, während die Proteinzone langsamer wandert, zurückbleibt und schließ-

lich verschwindet. Wird das Gel am Ende des Laufes angefärbt, so zeigt sich, daß dies durch Auftrennung in die verschiedensten Fraktionen bedingt war. Vergleiche der Trennung mit denen der freien Elektrophorese und der Ultrazentrifugation bestätigen, daß in der Disc-Elektrophorese Proteine sowohl nach Ladung wie nach Molekülgröße getrennt werden. Das Ausmaß des Molekülsiebeeftes wird durch die Konzentration des Monomers (Acrylamid) bei der Polymerisation des Trenngels bestimmt.

Aus dem vorher gesagten wird deutlich, daß Verfahren zur Disc-Elektrophorese auf wenige pH-Bereiche und Ionenkomponenten beschränkt sind. Hier kommt das im pH des Trenngels und pH des Elektrodenfachpuffers abgeänderte System für basische Proteine von REISFELD, LEWIS u. WILLIAMS (96) zur Anwendung.

In diesem System ist K^+ das "leading-ion", β -Alanin mit einem pK_a von 3,6 das "trailing-ion", und Essigsäure stellt mit einem pK_a von 4,8 die geeignetste Puffersubstanz dar. Mit einem pH von 4,6 im Trenngel können basische Proteine bei hinreichender Stabilität gut aufgetrennt werden. Das pH des "sample-gel" (6,7) ist 2 pH-Einheiten vom pK des Puffers entfernt und daher nur schwach gepuffert, es ist günstig, die Proteinprobe vorher auf dieses pH einzustellen.

Gerät: Shandon-Disc-Elektrophorese-Gerät (Fa. Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg).

Reagentien:

Stammlsg.:

- | | |
|--|--|
| (1a) 1 N KOH 48,0 ml;
Eisessig 16,4 ml;
Temed 4,0 ml;
mit H_2O auf 100 ml
pH 4,6. | (1b) 1 N KOH 48,0 ml;
Eisessig 2,9 ml;
Temed 0,46 ml;
mit H_2O auf 100 ml
pH 6,7. |
| (1c) Acrylamid 30,0 g;
Bis 0,8 g;
mit H_2O auf 100 ml. | (1d) Acrylamid 10,0 g;
Bis 2,5 g;
mit H_2O auf 100 ml. |
| (1e) Riboflavin 4 mg;
mit H_2O auf 100 ml. | (1f) Ammoniumpersulfat 0,28 g;
mit H_2O auf 100 ml. |

Diese Stammlsg. werden bei 4°C aufbewahrt und nach 4 Wochen erneuert, mit Ausnahme der Ammoniumpersulfat-Lsg., die bereits nach einer Woche unbrauchbar ist.

Der Elektroden-Puffer hat folgende Zusammensetzung:

(1g) β -Alanin 31,2 g;
Eisessig 8,0 ml;
mit H₂O auf 1 l, pH 5.0;

zum Gebrauch wird der Puffer 1:10 mit H₂O verdünnt.

Arbeitslösungen: Sie müssen jedesmal aus den Stammlsg. frisch hergestellt werden.

Trenngel:	5 %	10 %
	1 Teil (1a);	1 Teil (1a);
	1 Teil (1c);	2 Teile (1c);
	1 Teil H ₂ O;	3 Teile (1f).
	3 Teile (1f).	

Zwischengel:

1 Teil (1b);
2 Teile (1d);
1 Teil (1e);
4 Teile H₂O.

Probengel:

1 Teil (1b);
2 Teile (1d);
1 Teil (1e);
4 Teile DNase, beste Fraktion.

Ausführung:

Glasröhrchen (0,5 x 7 cm) werden an einem Ende durch Polyäthylenkappen verschlossen und in einer Reihe senkrecht aufgestellt.

Die frisch angesetzte Trenngel-Lsg. wird unter der Wasserstrahlpumpe kurz evakuiert und dann mit einer Spritze, deren abgewinkelte Nadel bis auf den Boden des Röhrchens reicht, bis 1 cm vom oberen Rand eingefüllt. Um eine ebene Geloberfläche zu bekommen, wird mit H₂O überschichtet.

Nach 40 - 60 min. ist die Polymerisation abgeschlossen (Ausbildung einer stabilen Gelfront gegen den Überstand). Der Überstand wird mit einem Filtrierpapier abgesaugt.

Dann werden 0,15 ml Zwischengel-Lsg. pro Röhrchen aufgetragen, mit H₂O überschichtet und zur Photopolymerisation im Abstand von 5 cm vor eine Tageslichtleuchte gestellt.

Die Polymerisation ist abgeschlossen, sobald das Gel seine Gelbfärbung verliert (Riboflavin wird reduziert) und trüb wird (15 min.).

Nun können 0,1 ml der Probengel-Lsg., sie sollen 0,2 - 0,5 mg Protein enthalten, pro Röhrchen aufgetragen werden. Sie werden wie das Zwischengel photopolymerisiert. Nach 20 min. sind die Gele fertig zur Elektrophorese.

Nach Abziehen der Polyäthylenkappen setzt man die Röhrchen so in die Kammer ein, daß das Probengel in das obere Elektrodenfach ragt. Beide Fächer werden mit je 250 ml des 1:10 verdünnten Elektrophoresepuffers gefüllt und die Platinelektroden eingesetzt.

Die Spannung wird mit solcher Polarität angelegt, daß sich die Kathode unten befindet. Bei einer Stromstärke von 5 mA pro Röhrchen beträgt die Trennzeit 2 Std.-

Am Ende des Laufes werden die Gele aus den Glasröhrchen entfernt und in ein Färbe- und Fixierbad verbracht.

Färbe- u. Fixierlsg.:

1 % Anilinblauschwarz in 7 % Essigsäure-Lsg.

Entfärbung:

Differenziert wird in einer 7 % Essigsäure-Lsg., in der die Gele auch aufbewahrt werden.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Spektralphotometer PMQ II mit Motorantrieb zum Chromatogrammansatz CA 2 (Zeiss, Wetzlar), das an einen Kompensationslinienschreiber (Linecomp, Fa. Hartmann u. Braun, Frankfurt) angeschlossen war. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 520 nm.

Lokalisation der DNase-Fraktion:

Dazu wurde ein Gel gleich nach Beendigung des Laufes in 0,5 cm breite Scheiben geschnitten und diese mit einem 0,1 M Trispuffer pH 7,6, der 1 mM $MgCl_2$ enthielt, extrahiert. Nach 24 Std. wurden die Fraktionen im viskosimetrischen Test auf DNase-Aktivität geprüft und die Befunde mit einem angefärbten Gel aus dem gleichen Lauf verglichen.

III. PRÄPARATION DER DESOXYRIBONUCLEASE

1. Übersicht über das Reinigungsverfahren:

1. Herstellung eines Trockenpulvers;
2. Extraktion der DNase mit einer 0,8 M NaCl-Lsg.;
3. 1. Ammoniumsulfat-Fällung zwischen 0,4 und 0,8 Sättigung;
4. 2. Ammoniumsulfat-Fällung zwischen 0,3 und 0,6 Sättigung;
5. Extraktion mit Magnesiumsulfat; der Ammonsulfatniederschlag aus (4.) wird mit einer 0,4 gesättigten MgSO_4 -Lsg. extrahiert;
6. Dialyse gegen eine 2×10^{-3} M MgCl_2 -Lsg.;
7. Adsorption des Enzyms an einen Phosphat-Cellulose-Ionenaustauscher; fraktionierte Elution mit einem Kaliumphosphat-Puffer;
8. Ionenvorlauf an DEAE-Cellulose-Austauscher; das Enzym wird unter den gewählten Bedingungen nicht adsorbiert;
9. 3. Ammoniumsulfat-Fällung bei 0,8 Sättigung zur Konzentration der Fraktion aus (8.);
10. Adsorption des Enzyms an einen CM-Sephadex-Ionenaustauscher und Elution mittels linearen Ionenstärkegradienten bei konstantem pH.

2. Die Reinigungsschritte im Einzelnen:

1. Herstellung eines Trockenpulvers

- 1.1 Verongia aerophoba wird gesäubert, zerkleinert und an der Luft getrocknet.
- 1.2 Das getrocknete Material wird in einer Kugelmühle zu einem feinen Pulver gemahlen.

2. Extraktion der DNase

- 2.1 Je 1 kg des Trockenpulvers (1.2) werden mit 4 l einer 0,8 M NaCl-Lsg. versetzt und verbleiben unter ständigem Rühren 36 Std. bei 4°C.
- 2.2 Zentrifugation: 30 min. bei 5500 x g und 4°C.
- 2.3 Bodensatz wird erneut extrahiert;

2.3 Überstand (Extrakt) wird weiter verarbeitet.

3. 1. Ammoniumsulfat-Fällung

3.1 Durch Zugabe von Ammoniumsulfat in Substanz zum Extrakt (2.3) wird eine 0,4 gesättigte Lsg. hergestellt (0,25 g Ammoniumsulfat pro ml Extrakt bei 18°C).

3.2 Zentrifugation: 30 min. bei 5500 x g und 18°C.

3.3 Bodensatz verwerfen;

Überstand wird weiter verarbeitet.

3.4 Zum Überstand (3.3) wird Ammoniumsulfat zugegeben, bis eine 0,8 gesättigte Lsg. entsteht (gleiche Menge Ammoniumsulfat wie unter (3.1)).

3.5 Zentrifugation: 30 min. bei 5500 x g und 18°C.

3.6 Überstand verwerfen;

Bodensatz (1. Ammoniumsulfat-Fällung) wird weiter verarbeitet.

4. 2. Ammoniumsulfat-Fällung

4.1 Der Bodensatz (3.6) wird im doppelten seines eigenen Volumens in Aqua dest. aufgeschwemmt.

4.2 Zentrifugation: 15000 x g 15 min. bei 18°C.

4.3 Bodensatz verwerfen;

Überstand wird weiter verarbeitet.

4.4 Pro ml Überstand (4.3) werden 0,25 g Ammoniumsulfat hinzugefügt, sodaß eine 0,6 gesättigte Lsg. entsteht.

4.5 Zentrifugation: 15 min. bei 15000 x g und 18°C.

4.6 Überstand verwerfen;

Bodensatz (2. Ammoniumsulfat-Fällung) wird weiter verarbeitet.

5. Extraktion mit Magnesiumsulfat

5.1 Der Bodensatz (4.6) wird mit dem doppelten seines eigenen Volumens einer 0,4 gesättigten Magnesiumsulfat-Lsg. (0,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ pro ml H_2O) 2 Std. bei 18°C extrahiert.

5.2 Zentrifugation: 60 min. bei 18000 x g und 4°C.

- 5.3 Bodensatz verwerfen;
Überstand (Magnesiumsulfat-Extrakt) wird weiter ver-
arbeitet.

6. Dialyse

- 6.1 Der Überstand (5.3) wird in Visking-Dialysierschläuche
(Größe 20/100 FT; Visking-Company, Chicago 38, Illinois,
U.S.A.) gegeben und 36 Std. bei 4°C gegen das 50fache
Volumen einer $0,002\text{ M MgCl}_2$ -Lsg. dialysiert.
- 6.2 Ein dabei auftretender Niederschlag wird durch Zentri-
fugation (30 min. bei $18000 \times g$ und 4°C) entfernt.
- 6.3 Bodensatz verwerfen;
Überstand (Dialysat) wird weiter verarbeitet.

7. Phosphat-Cellulose

- 7.1 Vorbereitung des Austauschers zur Chromatographie:
1. die trockene Phosphat-Cellulose (Cellex P, Kapazi-
tät $0,85 \pm 0,1\text{ mÄquiv./g}$; Bio Rad Laboratories,
Richmond, California, U.S.A.) wird in $0,5\text{ M NaOH}$
suspendiert, mehrfach aufgerührt und feine Par-
tikel durch Dekantieren entfernt;
 2. der Austauscher wird auf eine Glasfritte gegeben
und mit $0,5\text{ N NaOH}$ gewaschen, bis der Durchlauf völ-
lig farblos ist;
 3. es wird mit Aq. dest. nachgewaschen;
 4. der Austauscher wird in $0,5\text{ N HCl}$ suspendiert;
 5. die Säure wird mit Aq. dest. ausgewaschen.
- 7.2 Präparation einer Phosphat-Cellulose-Säule:
1. eine Chromatographie-Säule der Abmessungen $2 \times 25\text{ cm}$
wird mit Äquilibrierungs-Puffer ($0,05\text{ M KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -
Puffer mit $0,05\text{ M NaCl}$) gefüllt;
 2. aus dem Vorratsgefäß darf der Austauscher in der
Säule bis zu einer Höhe von 2 cm sedimentieren,
dann wird die Säule unter leichtem Fließenlassen bis
zu einer Höhe von 22 cm gepackt;
 3. es wird mit Äquilibrierungs-Puffer so lange ge-
waschen, bis ein pH von $6,5$ erreicht ist;

4. ein Überschuß von NaCl wird durch Waschen mit 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 6,5 entfernt.
- 7.3 Aufbringen des Dialysats:
 1. das Dialysat (6.3) wird 1:1 mit 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 6,5 verdünnt;
 2. 150 ml (7.3.1) werden mit einer Tropfgeschwindigkeit von 60 ml pro Stunde in die Säule eingespeist.
- 7.4 Fraktionierte Elution:
 1. es wird mit einem 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 6,5 solange eluiert, bis die Extinktion ($E_{280\text{nm}}$) des Durchlaufs unter 0,2 sinkt;
 2. es wird auf einen 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 7,2 umgeschaltet und ebenfalls solange eluiert, bis die Extinktion des Durchlaufs weniger als 0,2 beträgt;
 3. jetzt wird mit einem 0,2 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 7,2 eluiert und Fraktionen zu je 5 ml aufgefangen.
- 7.5 Nachweis der DNase-haltigen Fraktion:
 1. je 10 μl aus den Fraktionen (7.4.3) werden im Plattentest (Seite 20) auf DNA-Agar-Platten getestet, es genügt eine Inkubationszeit von 2 Std. bei 37°C , um die aktiven Fraktionen sicher nachzuweisen;
 2. es werden die viskosimetrischen Aktivitäten der DNase-haltigen Fraktionen bestimmt;
 3. es werden die Extinktionen bei 280 nm gemessen, um die spezifische Aktivität dieser Fraktionen zu bestimmen.

8. DEAE-Cellulose

- 8.1 Vorbereitung des Austauschers zur Chromatographie:
 1. die trockene DEAE-Cellulose (Cellex D, Kapazität $0,7 \pm 0,1$ mÄquiv./g; Bio Rad Laboratories, Richmond, California, U.S.A.) wird in 1 M NaOH suspendiert, mehrfach aufgerührt und feine Partikel durch Dekantieren entfernt;
 2. der Austauscher wird auf eine Glasfritte gegeben und mit 0,5 M NaOH gewaschen, bis der Durchlauf völlig farblos ist;

3. es wird mit Aq. dest. nachgewaschen;
 4. der Austauscher wird in 0,5 M HCl suspendiert;
 5. die Säure wird mit Aq. dest. ausgewaschen.
- 8.2 Präparation einer DEAE-Cellulose-Säule:
1. eine Chromatographie-Säule der Abmessungen 2 x 15 cm wird mit Äquilibrierungs-Puffer (0,2 M KH_2PO_4 / K_2HPO_4 -Puffer pH 7,2) gefüllt;
 2. aus dem Vorratsgefäß darf der Austauscher (8.1.5) bis zu einer Höhe von 2 cm sedimentieren, dann wird die Säule unter stetigem Fließenlassen bis zu einer Höhe von 10 cm gepackt;
 3. es wird mit dem Äquilibrierungs-Puffer solange gewaschen, bis der Durchlauf ein pH von 7,2 aufweist.
- 8.3 Aufbringen der Probe:
1. bis zu 100 ml der vereinigten Fraktionen aus (7.4.3) können aufgetragen werden;
 2. es werden sofort (die DNase wird unter diesen Bedingungen nicht festgehalten) Fraktionen zu 10 ml aufgefangen.
- 8.4 Elution:
1. es wird mit einem 0,2 M KH_2PO_4 / K_2HPO_4 -Puffer pH 7,2 eluiert, bis die Extinktion ($E_{280\text{nm}}$) des Durchlaufs unter 0,2 sinkt;
 2. die proteinhaltigen Fraktionen aus (8.3.2) und (8.4.1) werden zur Fraktion DEAE-Cellulose zusammengefaßt.
- 8.5
1. Viskosimetrische Aktivitätsbestimmung aus (8.4.2);
 2. Bestimmung von $E_{280\text{nm}}$ dieser Fraktionen.
9. 3. Ammoniumsulfat-Fällung
- 9.1 Durch Zugabe von 0,6 g Ammoniumsulfat pro ml Fraktion (8.4.2) wird eine 0,8 gesättigte Salzlösung hergestellt, die 5 Std. bei 4°C stehen bleibt;
- 9.2 Zentrifugation: 15 min. bei 15000 x g und 4°C.
- 9.3 Überstand verwerfen;
- der Bodensatz wird in einem 0,01 M KH_2PO_4 / K_2HPO_4 -Puffer pH 6,5 gelöst, sodaß seine Extinktion bei 280 nm und

einer Schichtdicke von 1 cm etwa 4 beträgt (3. Ammoniumsulfat-Fällung).

10. CM-Sephadex

10.1 Vorbereitung des Austauschers zur Chromatographie:

1. CM-Sephadex c-50 coarse, Kapazität $4,5 \pm 0,5$ mÄquiv. pro g (Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden), darf im mehrfachen seines eigenen Volumens an Aqua dest. quellen;
2. der Austauscher wird auf eine Glasfritte gegeben und mit 0,5 N NaOH gewaschen;
3. es wird mit Aqua dest. gewaschen;
4. es wird mit 0,5 N HCl gewaschen;
5. überschüssige Säure wird mit Aqua dest. ausgewaschen;
6. der Austauscher wird in 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 6,5 suspendiert.

10.2 Präparation einer CM-Sephadex-Säule:

eine Chromatographie-Säule der Abmessungen 1 x 20 cm wird bis zu einer Höhe von 15 cm mit Austauscher gepackt und mit dem 0,05 M Phosphat-Puffer pH 6,5 äquilibriert.

10.3 Auftragen der Probe:

es werden 10 ml der Fraktion (9.6) in den Austauscher gewaschen, möglichst ohne die Oberfläche des Ionenaustauschers aufzuwirbeln.

10.4 Elution:

Es wird bei einer Fließgeschwindigkeit von 15 ml pro Std. ein linearer Ionenstärkegradient von 0,05 bis 0,5 M Phosphat-Puffer bei einem konstanten pH von 6,5 angelegt und Fraktionen zu 5 ml aufgefangen.

Apparatur zur Gradientenelution:

Zwei gleiche Vorratsgefäße A und B werden mit je 250 ml Puffer, Gefäß A mit einem 0,5 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 6,5 und Gefäß B mit einem 0,05 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 6,5 gefüllt. A und B werden über ein U-Rohr miteinander verbunden und B mit einem Magnetrührer durchmischt. Aus B wird mittels einer Mini-Flow-Pumpe

(Fa. LKB-Produkters AB, Stockholm 12, Schweden) ein konstantes Volumen in die Säule eingespeist. Das Eluat läuft über einen UV-Schreiber (Uvicord der Fa. LKB-Produkters) zum Fraktionssammler.

- 10.5 Die erhaltenen Fraktionen werden im Plattentest auf DNase-Aktivität geprüft;
die Aktivität dieser Fraktionen wird viskosimetrisch bestimmt und nach Messung der Extinktion bei 280 nm deren spezifische Aktivität errechnet.

IV. ERGEBNISSE

1. Darstellungsverfahren

a) Extraktion

Um schon im nächsten Schritt auf einen Ionenaustauscher übergehen zu können, wurde die Extraktion bei möglichst niedrigen Ionenstärken angestrebt. Es zeigte sich jedoch, daß die Schwammnuclease erst bei relativ hohen Salzkonzentrationen in Lösung geht.

Tabelle 1

Enzymausbeute (in AE/ml) in Abhängigkeit von der Salzkonzentration des Extraktionsmittels (20 g Trockenpulver in 100 ml Lsg., 24 Std. bei 4°C geschüttelt).

Ionenstärke	NaCl	MgSO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄
0,001	0,02	0,03	0,02
0,01	0,04	0,08	0,05
0,1	0,10	0,36	0,14
0,5	0,95	0,92	0,70
1,0	1,04	0,96	0,62
1,5	0,98	0,81	0,44
2,0	0,90	0,72	0,20

Der Extraktion mit einer NaCl-Lösung wurde der Vorzug gegeben, weil sie nicht nur (geringfügig) bessere Ausbeuten erbringt, sondern sich das Feld guter Ausbeuten über einen weiteren Konzentrationsbereich erstreckt, sodaß Unterschiede im Salzgehalt des Ausgangsmaterials ohne größeren Einfluß bleiben.

Das im NaCl-Extrakt gemessene pH liegt zwischen 6,3 und 6,7. Wird mit 1 N NaOH ein pH von 7,5 bzw. 8,0 eingestellt, so verschlechtert sich die Ausbeute, ebenso erzielen Extraktionen bei pH-Werten unter 6,0 geringere Ausbeuten. Der Überstand des NaCl-Extraktes kann bis zu einer Woche bei 4°C gelagert werden, ohne an Aktivität zu verlieren. In der Regel wird sogar eine Zunahme von 10 - 15 % gegenüber der am Ende der Extraktion gemessenen Aktivität beobachtet.

Aus einem Kilogramm Trockenpulver können mit dem angegebenen Verfahren (mit Reextraktion) zwischen 5 und 6000 vis-

kosimetrischer Aktivitätseinheiten extrahiert werden, was einer DNA-abbauenden Aktivität von 10 - 12 mg kristallisierten Pankreas-DNase entspricht. Der Proteingehalt beträgt im Mittel 95 mg/ml Extrakt; damit errechnet sich die spezifische Aktivität zu 0,008 AE/mg Protein.

b) 1. Ammoniumsulfat-Fällung

Bei der 1. Ammonsulfat-Fällung mußte eine relativ breite Fällungsbande angewendet werden, da die DNase-Aktivitäten über mehrere Fraktionen verteilt in den Bodensatz gehen. Löst man den Niederschlag in destillierten Wasser auf, so finden sich in der dunkelbraun gefärbten Lösung 95 % der eingesetzten Enzymmenge mit einer 12fach besseren spezifischen Aktivität wieder.

c) 2. Ammoniumsulfat-Fällung

Wiederholt man jetzt die Ammonsulfat-Fällung mit engeren Fällungsbanden, so kann ein Teil des gefärbten Proteins abgetrennt werden. Der Verlust hält sich mit 10 % in Grenzen, die spezif. Aktivität steigt auf 0,20 und liegt damit 25-fach über der des Extraktes. Ein weiterer Vorteil der 2. Fällung besteht darin, daß jetzt mit kleineren Volumina gearbeitet werden kann, vor allem im Hinblick auf die nachfolgende Dialyse.

d) Extraktion mit Magnesiumsulfat

Durch diesen Schritt kann die spezif. Aktivität auf 0,45 erhöht werden, ohne daß nennenswerte Verluste auftreten, sodaß an eine Inhibitorabtrennung oder eine Reaktivierung des Enzyms durch Mg^{++} -Ionen gedacht werden muß.

e) Dialyse

Letzteres scheinen die Befunde bei der Dialyse zu bestätigen: Selbst wenn man gegen einen 0,1 M Phosphat-Puffer pH 6,5 bzw. gegen einen 0,1 M Tris-Puffer pH 7,4 dialysiert, treten Verluste von 40 - 60 % der eingesetzten Aktivität auf. Wird dem Dialysemedium dagegen 2×10^{-3} M $MgCl_2$ zugesetzt, so bleibt die DNase vor Inaktivierung bewahrt. Ebenso wirkt der Zusatz von Substrat, also von DNA (5 mg auf 10^3 AE DNase), zum Dialysat stabilisierend auf das Enzym.

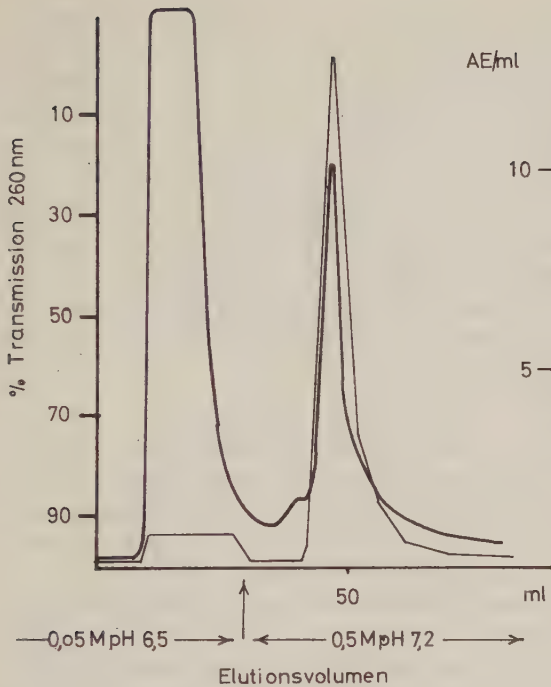


Fig. 2: 1. Elutionsdiagramm von Phosphat-Cellulose. Ordinate, linke Skala: Transmission bei 260 nm als näherungsweise Ausdruck für die Proteinkonzentration (—); rechte Skala: DNase-Aktivität in AE/ml (---). Abszisse: Elutionsvolumen, bei ↑ Übergang auf 0,5 M Phosphat-Puffer pH 7,2.

f) Phosphat-Cellulose

Die Chromatographie des Dialysats an Phosphat-Cellulose stellt den wirksamsten Schritt dieses Reinigungsverfahrens dar. Einmal, weil die Bedingungen bei der Adsorption so scharf gewählt sind, daß dabei mehr als 90 % des Gesamtproteins im Durchlauf erscheinen, aber nur 8 - 10 % der DNase-Aktivität. So kann allein durch Adsorption bei niedriger (0,05 M Phosphat, pH 6,5) und Desorption bei einer 10fachen höheren (0,5 M Phosphat, pH 7,2) Ionenstärke eine 600fache Reinigung gegenüber dem Extrakt erzielt werden.

Dieses Verhalten wird durch das 1. Elutionsdiagramm (Fig.2) demonstriert. Zum anderen gelingt es durch fraktionierte Elution, den bei 0,5 M Phosphat einheitlichen Proteinpeak in vier einzelne Gipfel zu zerlegen, wobei die DNase-haltige Fraktion sofort nach Umschalten auf den 0,2 M Phosphat-Puffer erscheint (Fig.3: 2. Elutionsdiagramm von Phosphat-Cellulose). Die so erhaltene leicht gelb gefärbte Fraktion enthält 80 % der eingesetzten Enzymaktivität mit einer spezif. Aktivität von 18,0; sie verliert aber beim Stehenlassen (4°C) zunehmend an Aktivität (nach 3 Tagen 4°C noch 50 %), sodaß der nächste Schritt möglichst gleich angeschlossen werden sollte, zumal nach der DEAE-Cellulose eine stabile Fraktion erhalten wird.

g) DEAE-Cellulose

Unter den angegebenen Bedingungen kommt die DNase nicht zur Adsorption, sondern erscheint nach einem Säulenvolumen im Durchlauf. Trotz der hohen Ionenstärke (0,2 M Phosphat) wird ein gelb gefärbtes Protein am oberen Teil des Austauschers festgehalten und die spezif. Aktivität steigt auf 24 AE/mg Protein. Beim Säulenverfahren treten im Gegensatz zum satzweisen Verfahren ("batchwise-operation"), bei dem der Austauscher in die Lösung eingebracht und dann abzentrifugiert wird, kaum Verluste auf.

h) 3. Ammoniumsulfat-Fällung

Die 3. Ammoniumsulfat-Fällung dient nur der Konzentration. Eine fraktionierte Fällung zur weiteren Reinigung erwies sich als zu verlustreich.

i) CM-Sephadex

Durch einen Ionenstärkegradienten bei konstantem pH an CM-Sephadex kann eine DNase-Fraktion mit einer spezif. Aktivität von 40 - 46 AE/mg Protein erhalten werden, wobei Verluste von 30 - 50 % der eingesetzten Enzymaktivität entstehen. Wie aus dem Elutionsdiagramm ersichtlich ist (Fig.4) erscheinen die Enzymaktivitäten mit scharfen Gipfel bei 0,18 M Phosphat.

Es ist bei diesem Schritt unbedingt erforderlich, zur Auf-

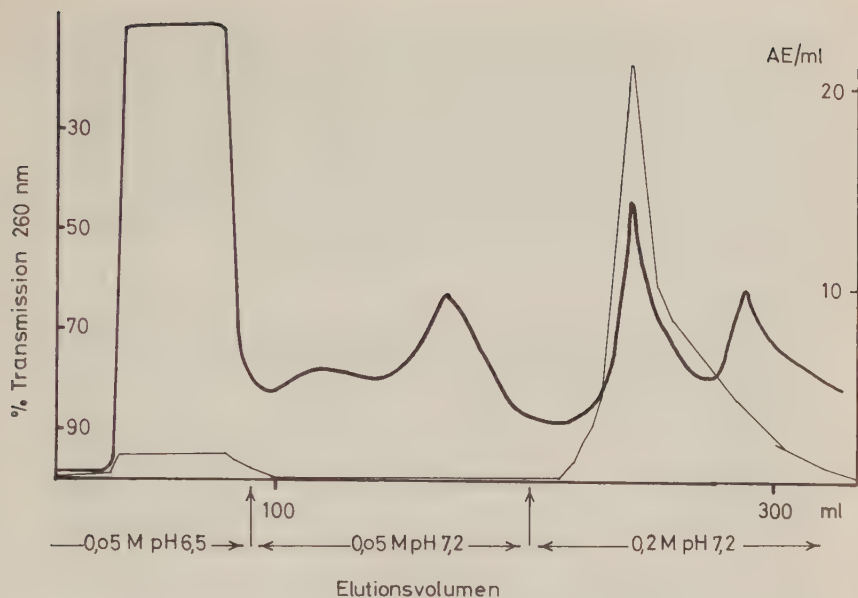
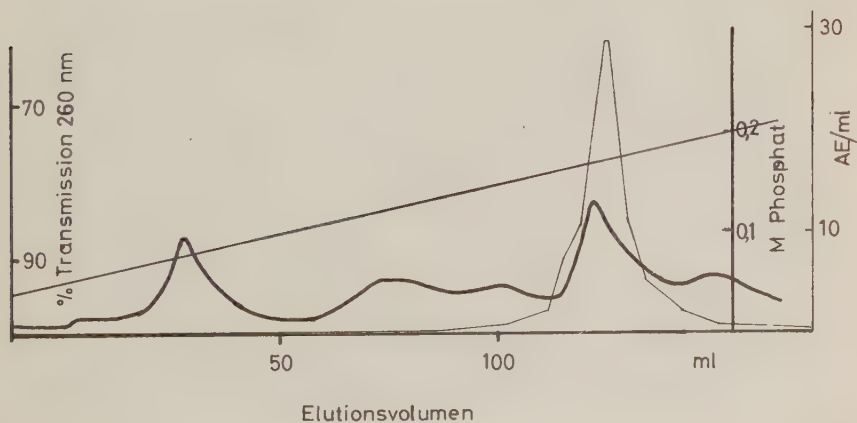


Fig. 3: 2. Elutionsdiagramm von Phosphat-Cellulose. Bezeichnungen wie in Fig. 2.

Fig. 4: Elutionsdiagramm von CM-Sephadex; linearer Ionenstärkegradient bei pH 6,5. Ordinate rechts, erste Skala: Molarität des Phosphat-Puffers. Übrige Bezeichnungen wie in Fig. 2.



rechterhaltung eines langsamen und gleichmäßigen Durchflusses eine Pumpe zu benutzen, da der Durchflußwiderstand, infolge Kontraktion der Packung, während der Gradienten-Elution beträchtlich absinkt.

Die abschließende Tabelle gliedert die einzelnen Schritte des Darstellungsverfahrens nach spezifischer Aktivität, Reinigung, Ausbeute für den einzelnen Schritt und der Gesamtaktivität bei einer 1 kg Extraktion auf:

Tabelle 2

Reinigungsschritt	spez.Akt.	Reinigung	Ausbeute	Gesamt
Extrakt	0,008			3600
1. Ammonsulfat-Fllg.	0,10	12	95	3420
2. Ammonsulfat-Fllg.	0,20	25	90	3100
MgSO ₄ -Extrakt	0,45	56	100	3100
Dialyse	0,40	50	85-90	2600
Phosphat-Cell.	18	2200	80	2000
DEAE-Cell.	24	3000	100	2000
3. Ammonsulfat-Fllg.	24	3000	90	1800
CM-Sephadex	42-46	5300	50-70	1100

2. Eigenschaften der Desoxyribonuclease

a) Einheitlichkeit des Enzyms

Obwohl die DNase aus *Verongia aerophoba* nach der letzten Reinigungsstufe in einer 5000fach angereicherten Form vorliegt, ist diese Fraktion nicht einheitlich. In der Disc-Elektrophorese stellen sich bei einem pH von 4,6 im Trenngel 3 Fraktionen dar (Fig.5). Der unter diesen Bedingungen am langsamsten wandernden Fraktion konnte die DNase-Aktivität zugeordnet werden, ihr Anteil am Gesamtprotein beträgt ca. 15 %. Wird durch Erhöhung der Acrylamid-Konzentration auf 10 % die Maschenweite des Trenngels verkleinert, so wird zwar eine Verminderung der Wanderungsgeschwindigkeit, aber keine Veränderung des Proteindiagramms beobachtet. Dies berechtigt zu der Annahme, daß die jeweils erhaltenen Fraktionen zumindest im Molekulargewicht einheitlich sind.

Daneben erlauben die Befunde bei der Disc-Elektrophorese noch eine Aussage über die Art des DNase-Proteins: Es muß

sich danach um ein basisches Protein handeln, dessen isoelektrischer Punkt weit im Alkalischen liegt, jenseits 8,3, da im System von DAVIS u. ORNSTEIN (95) keine Wanderung zur Anode eintritt. Im Gegensatz zur Pankreas-DNase I, die in diesem System wandert und sich, obwohl das kristallisierte Enzym eingesetzt wurde, in ebenfalls 3 Fraktionen auftrennte.

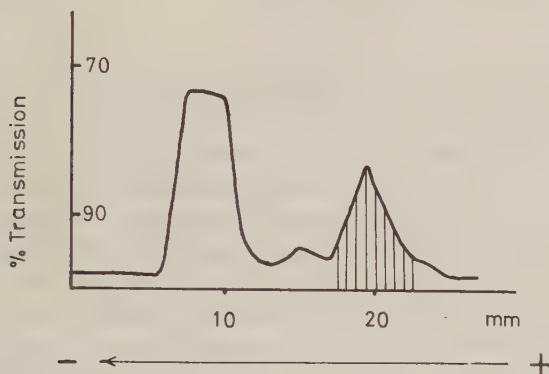


Fig.5: Auftrennung der Schwamm-Nuclease (Fraktion 10) in der Disc-Elektrophorese bei pH 4,6. Ordinate: mm Gellänge; Abszisse: % Transmission bei 520 nm. Schraffierte Fläche: DNase-Aktivität.

b) Verunreinigung durch andere Enzyme

Wesentlich für die Brauchbarkeit einer Enzympräparation ist deren Gehalt an anderen Enzymen, die dasselbe Substrat angreifen. Hier kam es vor allem darauf an, Phosphodiesterase, Phosphatase und Ribonuclease-Aktivitäten zu erfassen. Alle diese Enzyme sind im Ausgangsextrakt nachweisbar, nachfolgend sind die im Extrakt (2.3) gemessenen Aktivitäten angegeben:

Phosphodiesterase: 9 μ M p-Nitrophenol/Std. und ml Extrakt;
alkal. Phosphatase: 15 μ M p-Nitrophenol/Std. u. ml Extrakt;
saure Phosphatase: 2 μ M p-Nitrophenol/Std. und ml Extrakt;
Ribonuclease: 2,3 Einheiten pro ml Extrakt.

In der besten Fraktion sind weder Phosphodiesterase noch Phosphatase, jedoch Spuren von Ribonuclease-Aktivitäten nachweisbar. Inkubiert man gereinigte Verongia-DNase einmal mit DNA und einmal mit RNA als Substrat und vergleicht jeweils den Anstieg der säurelöslichen Spaltprodukte, so kommt man auf ein Verhältnis von DNase- zu RNase-Aktivitäten wie 1 : 0,002. Kristallisierte Pankreas-DNase I weist einen noch 5 mal niedrigeren RNase-Anteil auf.

c) pH-Optimum

In der von ZAHN et al. (74) angegebenen Anordnung zur DNase-Aktivitätsbestimmung am Titrigrafen wird der Laugenverbrauch in % einer 5 mM NaOH gegen die Zeit aufgetragen. Nachdem man den Laugenverbrauch während einer Reaktionszeit von 10 min. bestimmt hat, ergibt sich die Enzymaktivität aus folgender Überlegung: 100 % Laugenverbrauch entsprechen 0,5 ml einer 0,005 M NaOH, diese Lösung enthält 25×10^{-7} Mol OH^- -Ionen, die bei konstantem pH die gleiche Anzahl H^+ -Ionen binden. Pro Mol gespaltener Phosphodiesterbindungen werden ein Mol H^+ -Ionen frei, sodaß die Zahl für den Laugenverbrauch lediglich mit 25×10^{-9} multipliziert werden muß, um die Enzymaktivität in 10^{-9} Mol gespaltener Phosphodiesterbindungen pro Minute zu erhalten. In der Tabelle 3 sind für das jeweils vorgegebene pH Laugenverbrauch und Enzymaktivität aufgeführt und in Fig.6 die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH dargestellt.

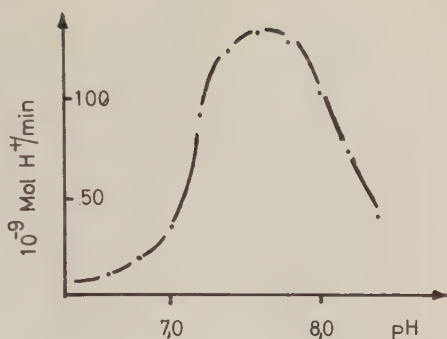
Mit dieser Methode bestimmt man für die Verongia-DNase ein pH-Optimum von 7,6; eine viskosimetrische Aktivitätseinheit spaltet unter den angegebenen Bedingungen 520×10^{-9} Mol Phosphodiesterbindungen pro Minute.

Tabelle 3:

pH	6,4	6,6	6,8	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,0	8,2	8,4
Laugenverbrauch	3	4	7	14	36	49	52	50	40	29	16
Enzymaktivität	8	10	18	35	90	122	130	125	100	73	40

Laugenverbrauch in % einer 5 mM NaOH während 10 min.; Enzymaktivität in 10^{-9} Mol H^+ /min.-

Fig.6: Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH.
Ordinate: Enzymaktivität in 10^{-9} M H^+ /min.
Abszisse: pH der Lag.



d) Aktivierung durch Ionen

Die Salzkonzentration, die zur maximalen Aktivierung bei gegebenem pH erforderlich ist, hängt von beiden Bestandteilen, der Art der Anionen wie der Kationen, ab. Dieses Verhalten wird am Beispiel einiger Salze demonstriert.

Tabelle 4:

N bedeutet die Normalität des Salzes; E 260 bezeichnet die Extinktion der säurelöslichen Reaktionsprodukte (Lanthannitratmethode) und % bezieht sich auf die im Ansatz ohne Elektrolyte gemessene Aktivität.

N	(NH ₄)Cl		(NH ₄) ₂ SO ₄		MgCl ₂		MgSO ₄	
	E ₂₆₀	%	E ₂₆₀	%	E ₂₆₀	%	E ₂₆₀	%
0,01	0,35	110	0,37	115	0,80	250	1,27	410
0,02	0,38	120	0,40	125	1,17	365	1,76	550
0,03	0,46	145	0,45	140	1,69	530	1,80	565
0,04	0,48	150	0,53	165	1,92	600	1,78	555
0,05	0,50	155	0,54	170	1,95	610	1,62	505
0,06	0,54	170	0,58	180	1,79	560	1,39	435
0,07	0,60	190	0,55	170	1,54	475	1,13	360
0,08	0,62	195	0,51	160	1,28	400	0,99	280
0,09	0,64	200	0,40	125	1,05	330	0,67	210
0,10	0,57	180	0,27	85	0,83	260	0,42	130

Wie zu erwarten aktivieren Magnesiumsalze weit stärker als Ammoniumsalze, aber auch bei jeweils gleichem Kation zeigen sich Unterschiede zwischen der Sulfat- und der Chloridform. Der Kurvenverlauf (Fig.7) zeigt für die Sulfatform bei ähnlichen Anfangssteigungen eine maximale Aktivierung bei niedrigeren Konzentrationen, was auf einen Hemmeffekt des

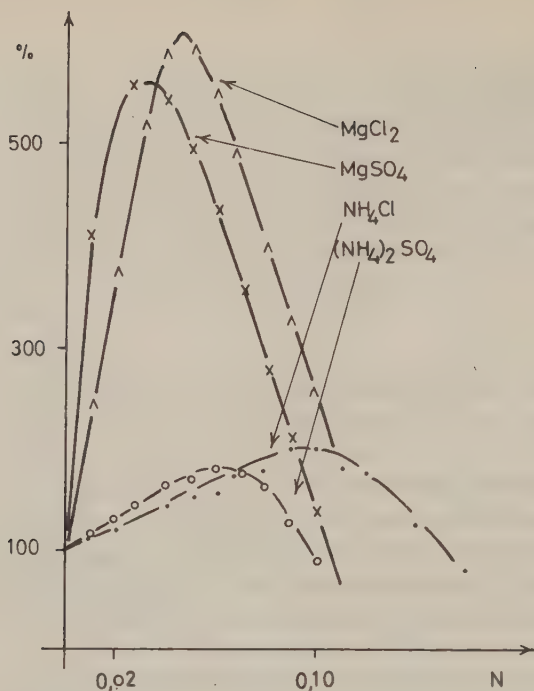


Fig.7: Einfluß verschiedener Salze auf die DNase-Aktivität.
Abszisse: relative Enzymaktivität in % des Standards.
Ordinate: Normalität des Salzes im Enzym-Substrat-Gemisch.

mehrwertigen Anions deutet.

In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse für verschiedene zweiwertige Kationen zusammengefaßt und in Fig.8 graphisch dargestellt. Alle Salze lagen in der Chloridform vor. Wenn wir die zweiwertigen Kationen mit gleichem Anion bei pH 7,6 vergleichen, so erhalten wir, nach abnehmender Fähigkeit zur DNase-Aktivierung, die Reihe: Mg-Mn-Co-Ca-Sr-Ba. Ihre optimalen Konzentrationen liegen zwischen 0,04 und 0,06 N und der Grad der Aktivierung variiert von 610 (Mg^{++}) bis 300 % (Ba^{++}) des Standards.

Außerdem wurde der Einfluß von Ca^{++} auf Proben, die bereits maximal durch Mg^{++} bzw. Mn^{++} aktiviert waren, geprüft. Dabei betrugen die $CaCl_2$ -Konzentrationen $1/100$, $1/10$ und $1/1$ der

Tabelle 5:

Bezeichnungen wie in Tabelle 4. Alle Salze wurden als Chlorid verwendet.

N	Mn ⁺⁺		Ca ⁺⁺		Ba ⁺⁺		Co ⁺⁺		Sr ⁺⁺	
	E ₂₆₀	%	E ₂₆₀	%	E ₂₆₀	%	E ₂₆₀	%	E ₂₆₀	%
0,01	0,61	190	0,53	165	0,41	130	0,57	180	0,48	150
0,02	0,96	300	0,77	240	0,61	190	0,83	260	0,64	200
0,03	1,34	420	0,95	300	0,74	230	1,05	330	0,80	250
0,04	1,54	475	1,12	350	0,94	290	1,21	380	1,01	310
0,05	1,68	525	1,18	370	0,96	300	1,36	425	1,06	330
0,06	1,72	535	1,12	360	0,95	295	1,41	440	1,09	340
0,07	1,66	510	1,09	340	0,83	260	1,37	430	0,99	310
0,08	1,47	460	1,02	320	0,73	230	1,28	400	0,83	260
0,09	1,37	430	0,96	280	0,57	180	1,15	360	0,76	240
0,10	1,15	360	0,73	230	0,48	150	1,04	325	0,64	200
0,11	1,04	325	0,64	200	0,35	110	0,86	270	0,54	170
0,12	0,86	270	0,54	170	0,22	70	0,74	230	0,44	140

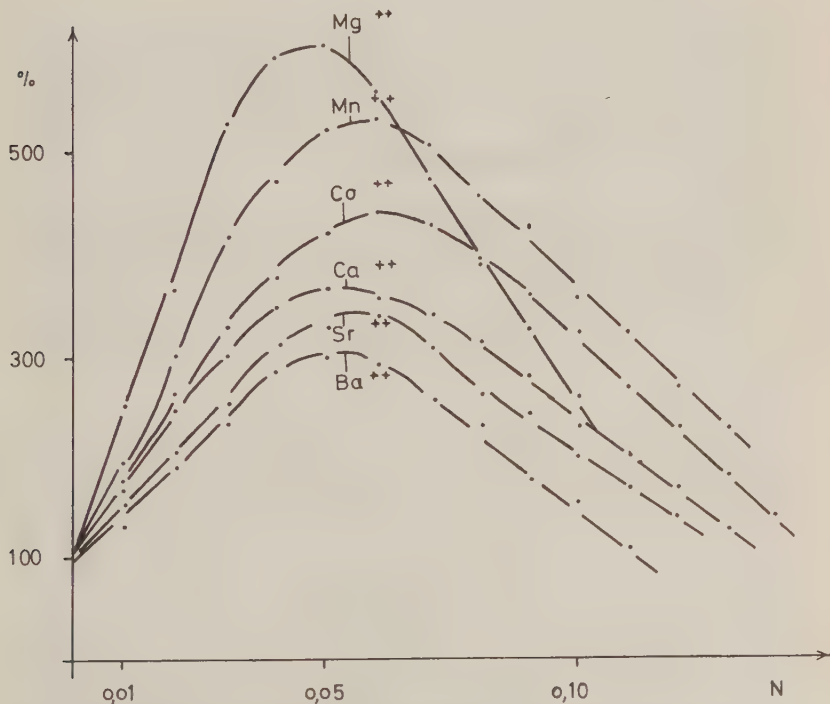


Fig. 8: Einfluß verschiedener zwei-wertiger Kationen auf die DNase-Aktivität. Bezeichnungen wie in Fig. 7.

Magnesium- bzw. Mangan-Konzentration. Unter keiner dieser Bedingungen konnte ein zusätzlicher aktivierender Effekt der Ca^{++} beobachtet werden.

Der Einfluß ein-wertiger Kationen (Na^+ , K^+ , Cs^+) ist geringer und liegt bei Konzentrationen von 0,05 bis 0,08 N zwischen 180 und 200 % des Standards. Wird die Ionenstärke des Puffers im Testansatz erhöht, so nimmt ihre Wirkung weiter ab, was ebenfalls darauf hinweist, daß die Reaktionsbeschleunigung durch diese Ionen unspezifisch ist. Bei höheren Ionenstärken tritt eine deutliche Hemmung ein, so zeigt die DNase in 0,15 N NaCl nur noch 20 % der Aktivität des Standards. Interessant ist, daß diese Hemmung ein-wertiger Ionen durch Zusatz von Mg^{++} (0,04 N) aufhebbar ist.

e) Abbaubarkeit hitzedenaturierter DNA

Tabelle 6:

E 260 bezeichnet die Extinktion der unter DNase-Einwirkung freigesetzten säurelöslichen Reaktionsprodukte bei 260 nm (Lanthannitrat-Methode) und zwar (A) für native DNA, (B) für hitzedenaturierte DNA und (C) für native DNA, die 45 min. nach Reaktionsbeginn der Hitzebehandlung unterworfen, und nach erneutem Enzymzusatz wieder in den Test eingebracht wurde.

min.:	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150
(A)	0,22	0,46	0,70	0,94	1,15	1,40	1,50	1,54	1,56	1,62
E ₂₆₀ (B)	0,03	0,06	0,10	0,14	0,16	0,20	0,25	0,27	0,30	0,32
(C)			0,78	0,80	0,85	0,88	0,90	0,94	0,98	1,01

Danach baut die Desoxyribonuclease aus *Verongia aerophoba* native DNA ca. 7 mal schneller ab als hitzedenaturierte DNA. Die Kinetik der Hydrolyse nativer DNA scheint zwei-phasic zu verlaufen, mit einem initialen, relativ raschen Anstieg der säurelöslichen Spaltprodukte, gefolgt von einer zweiten, langsameren Phase, deren Anstieg dem bei hitzedenaturierter DNA beobachtbaren Zuwachs säurelöslicher Reaktionsprodukte vergleichbar ist. Durch Hitzebehandlung des kurzzeitig DNase ausgesetzten Ansatzes mit nativer DNA kann die Hydrolyse-rate abrupt in jene zweite, für den Abbau hitzedenaturierter

DNA charakteristische, Phase übergeführt werden (Fig.9).

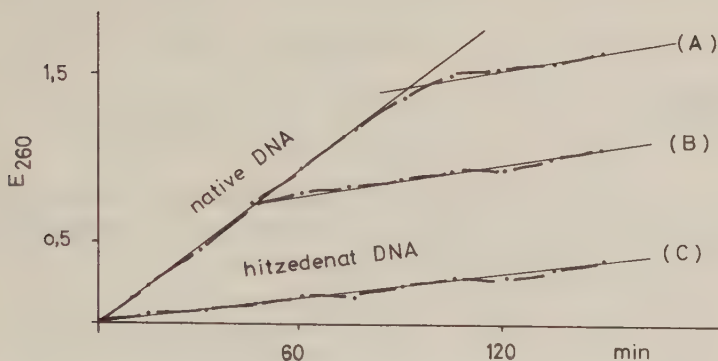


Fig.9: Abbaubarkeit nativer (A), hitzedenaturierter (C) und nach kurzzeitiger DNase-Einwirkung hitzedenaturierter DNA (B) durch die DNase aus *Verongia aerophoba*. Ordinate: Extinktion der säurelöslichen Spaltprodukte bei 260 nm. Abszisse: Reaktionszeit in Minuten.

f) Temperaturabhängigkeit der DNA/DNase-Reaktion

Nach der RGT-Regel (van't Hoff (1884)) steigt die Reaktionsgeschwindigkeit einer chemischen Reaktion mit der Temperatur exponentiell an und zwar entspricht einer Temperaturzunahme von 10°C eine Verdopplung bis Verdreifachung der Reaktionsgeschwindigkeit. Dieser Temperaturkoeffizient (Q_{10}) ist definiert durch:

$$(1) \quad Q_{10} = \frac{k_{t+10}}{k_t} ; \quad k = \text{Geschwindigkeitskonstante}; \quad t = \text{Temperatur.}$$

und bei zwei beliebigen Geschwindigkeitskonstanten (k_1, k_2) gemessen bei t_1 bzw. t_2 ($t_2 > t_1$):

$$(2) \quad \log Q_{10} = \frac{10}{t_2 - t_1} \log \frac{k_2}{k_1}$$

Die Tabelle 7 enthält die Beziehungen zwischen Temperatur und viskosimetrisch bestimmter Reaktionsgeschwindigkeit in 10^{-3} centipoises pro Minute (Mittelwert aus 11 Meßpunkten).

Um genügend Werte aus dem linearen Bereich der Abbaukurve zu erhalten, wurden ab 30°C nur noch halbe Enzymkonzentrationen (Enzym 1:1 mit 0,05 M Tris-Puffer pH 7,6) eingesetzt. In der Tabelle ist die Verdünnung bereits berücksichtigt.

Tabelle 7:

Temperatur:	15	20	25	30	35	40	45	50
10^{-3} cps./min.:	13	18	25	34	46	56	64	48

Nach Gleichung (2) errechnet sich für den Temperaturbereich zwischen 15°C und 35°C ein Q_{10} -Wert von 1,8. Das Temperaturoptimum liegt bei 45°C.

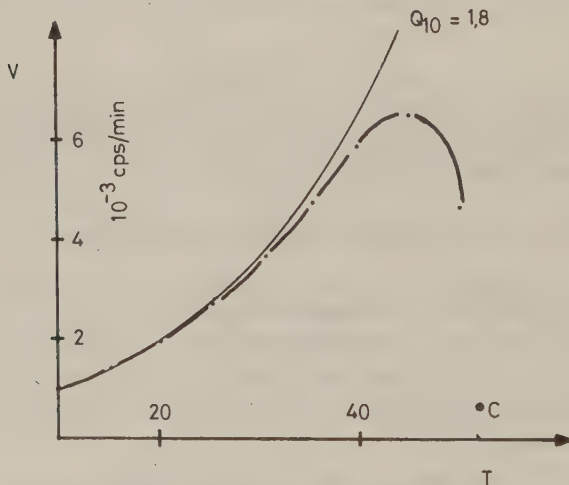


Fig.10: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur. Abszisse: Temperatur in °C. Ordinate: Reaktionsgeschwindigkeit in 10^{-3} centipoises pro Minute.

In die Reaktionsgeschwindigkeit/Temperatur-Kurve (Fig.10) ist noch die theoretische Kurve für einen Q_{10} -Wert von 1,8 eingezeichnet, sie stimmt mit der tatsächlich gemessenen nur bis etwa 35°C überein. Nach Erreichen des Temperaturoptimums verläuft die Kurve stark asymmetrisch.

Aus dem Grad der Temperaturabhängigkeit einer Reaktion läßt sich die Aktivierungsenergie (E) berechnen. Die Aktivierungs-

energie ist gleich jenem Energiebetrag, der aufgewendet werden muß, um die Moleküle in einen reaktionsbereiten Zustand zu überführen:

$$(3) \quad E = 40.600 \times \log Q_{10};$$

danach erhält man für die Aktivierungsenergie einen Betrag von 10.365 cal/mol.

g) Nachweis der Endonuclease-Wirkung

DNase-Aktivitätsbestimmung durch Viskosimetrie bzw. durch Messung des Anstiegs der säurelöslichen Reaktionsprodukte erfassen ganz verschiedene Enzymwirkungen am Substrat. Der Vergleich beider Methoden sollte daher eine Aussage über die Art des DNase-Angriffs auf DNA liefern. Erfolgt zum Beispiel der Abbau von den freien Enden des Makromoleküls her, so treten frühzeitig säurelösliche Produkte auf, während die verflüssigende Wirkung gering ist. Das Umgekehrte gilt, wenn die Spaltungen in der Mitte des DNA-Moleküls erfolgen.

Hier sind nun im Verhältnis gleiche DNA/DNase-Konzentrationen (8 mg DNA/0,01 AE DNase) mittels viskosimetrischen Tests und der Lanthannitrat-Methode untersucht worden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8:

(A) Viskosimetrischer Test: Ansatz wie unter II.2.a; DNase-Konzentration 0,045 AE. Cps bezeichnet die Viskosität der DNA-Lsg. in centipoises.

(B) Lanthannitrat-Methode: 8 mg DNA/0,01 AE DNase (DNA: 2 mg pro ml 0,05 M Tris-Puffer, pH 7,6); Mg^{++} : 4×10^{-2} N $MgCl_2$. E 260 bezeichnet die Extinktion der säurelöslichen Spaltprodukte bei 260 nm.

(A)				(B)	
min.	cps	min.	cps	min.	E ₂₆₀
0	9,25	11	4,30	10	0,026
1	8,85	12	2,85	20	0,062
2	8,40	14	3,10	30	0,105
3	7,95	16	2,75	40	0,160
4	7,50	18	2,20	Zusatz von 0,1 AE DNase	
5	7,00	20	1,90		
6	6,60	22	1,75	240	2,582
7	6,15	24	1,60		
8	5,60	26	1,55		
9	5,15	28	1,45		
10	4,70	30	1,40		

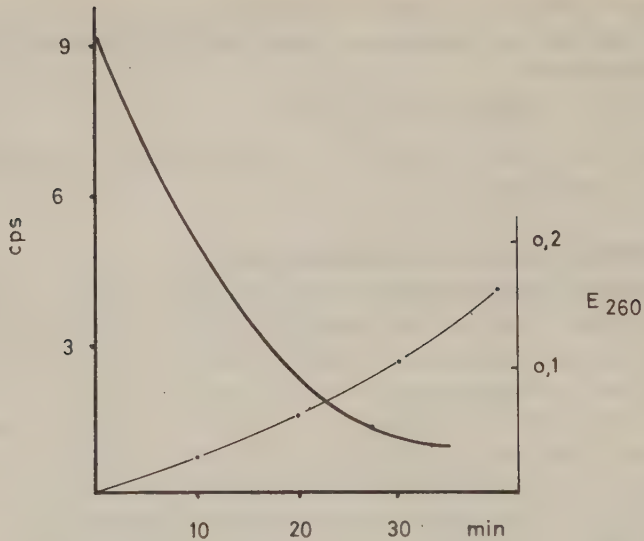


Fig.11: Vergleich der DNase-Wirkung auf DNA im viskosimetrischen Test und in der Lanthannitrat-Methode. Konzentrationen und Bezeichnungen wie in Tab. 8 angegeben.

Unter den gewählten Bedingungen nimmt die Viskosität der DNA-Lsg. in 10 min. um 50 % ab, in dieser Zeit sind aber erst 1 % der durch die Schwammnuclease maximal in die säurelösliche Form überführbaren Produkte entstanden. Danach führt die Behandlung hochmolekularer DNA mit dem Enzym zu einem raschen Abfall der Viskosität ohne korrespondierenden Anstieg niedermolekularer, säurelöslicher Reaktionsprodukte.

n) Bestimmung der Michaelis-Konstanten

Man kann durch Messen der Fermentaktivität bei verschiedenen Substratkonzentrationen ein Maß für die Affinität zwischen Enzym und Substrat gewinnen. Es ist leicht einzusehen, daß die zur Erreichung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit nötige Konzentration des Substrats sich nicht genau angeben läßt, weil die Annäherung an den Maximalwert asymptotisch erfolgt. Dagegen läßt sich experimentell die Substratkonzentration leicht feststellen, die einen bestimmten Bruchteil ergibt. Die Substratkonzentration, bei der die halbe maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist,

heißt die Michaelis-Konstante.

Eine für die graphische Auswertung der Beziehung zwischen Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit besonders geeignete Form ist von LINEWEAVER u. BURK (97) angegeben worden. Dabei werden $1/v$ und $1/(S)$ als Variable gewählt, sodaß die Gleichung

$$(4) \quad \frac{v_{\max}}{v} = 1 + \frac{k}{(S)} ;$$

in diesen Größen linear ist. Es bedeuten $v_{\max}$ die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, k die Michaelis-Konstante und (S) die Substratkonzentration. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszissenachse gibt $-1/k$, also den negativen reziproken Wert der Michaelis-Konstanten wieder.

Wie von ZAHN (74) angegeben, werden bei der Bestimmung der Substratkonzentration (in Mol DNA-Nucleotiden) die Relativkonzentrationen der Nucleotide zu je 25 % angenommen und mit einem mittleren Molekulargewicht von 327 für das Nucleotid gerechnet. Die Werte für die Reaktionsgeschwindigkeit beziehen sich auf Nucleotide, die durch DNase in Lanthannitrat-HCl löslich werden. Die Messung ergibt, unter der vereinfachenden Annahme der Relativkonzentrationen zu 25 %, eine mittlere Extinktion von 9,183 für 1 mMol Nucleotid pro Milliliter.

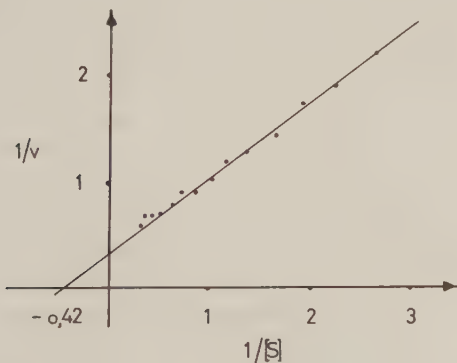


Fig.12: Lineweaver-Burk-Darstellung der Wirkung von Verongia-DNase auf Herings-DNA. Bezeichnungen wie in Tab. 9.

Tabelle 9:

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. Ansatz wie unter II.4 beschrieben. Nr. bezeichnet das jeweilige Röhrchen der Verdünnungsreihe, DNA die Konzentration in mg/ml, (S) die Substratkonzentration in 10^{-6} Mol DNA-Nucleotiden/ml, $1/(S)$ den reziproken Wert der Substratkonzentration, E_{260} die Extinktionssumme der durch DNase-Einwirkung löslich gewordenen Nucleotide bei 260 nm, v die Reaktionsgeschwindigkeit in 10^{-9} Mol Nucleotiden/min. und $1/v$ den reziproken Wert der Reaktionsgeschwindigkeit.

Nr.	DNA	(S)	$1/(S)$	E_{260}	v	$1/v$
1	1,2	3,67	0,27	2,135	1,94	0,52
2	1,020	3,12	0,32	1,955	1,77	0,56
3	0,867	2,65	0,38	1,795	1,63	0,61
4	0,737	2,25	0,44	1,575	1,43	0,69
5	0,626	1,91	0,52	1,455	1,32	0,76
6	0,532	1,63	0,61	1,425	1,29	0,78
7	0,452	1,38	0,72	1,275	1,16	0,86
8	0,384	1,17	0,85	1,200	1,09	0,92
9	0,326	0,99	1,00	1,065	0,97	1,03
10	0,277	0,84	1,18	0,915	0,83	1,20
11	0,235	0,71	1,39	0,825	0,75	1,33
12	0,199	0,60	1,64	0,750	0,68	1,47
13	0,169	0,51	1,93	0,610	0,55	1,80
14	0,143	0,43	2,28	0,555	0,50	2,00
15	0,122	0,31	2,68	0,480	0,44	2,23

In der Lineweaver-Burk-Darstellung (Fig.12) ist der Wert für $-1/k_m$ angedeutet, er beträgt - 0,42. Aus der gewonnenen Kurve errechnet sich eine Michaelis-Konstante von $2,2 \times 10^{-3}$ M für das System Verongia-DNase/Herings-DNA.

V. DISKUSSION

1. Messmethodik

Zur Messung von DNase-Aktivitäten sind eine ganze Reihe verschiedener Methoden publiziert worden (Übersicht bei KURNICK (3)), dies deutet schon darauf hin, daß es schwierig ist, eine allgemein befriedigende Methode zu finden. In dieser Arbeit sind die Titration der durch Esterspaltung frei werdenden H^+ -Ionen, die Zunahme des säurelöslichen Anteils der DNA und die Viskositätsabnahme zur DNase-Aktivitätsbestimmung herangezogen worden.

Die durch DNasen katalysierte Reaktion besteht in der Hydrolyse einer Phosphodiesterbindung, erst sekundär kommt es zum Aufbruch von Wasserstoffbrücken (hyperchromer Effekt). Die entstehenden Abbauprodukte sind chemisch uneinheitlich (Säurelöslichkeit) und synthetische Substrate stehen für DNasen noch nicht zur Verfügung. Daher kann ein Ausdruck für die Enzymaktivität in molaren Einheiten nur gewonnen werden, wenn die durch Hydrolyse bedingte Änderung der H^+ -Ionenkonzentration verfolgt wird. Titrimetrische Verfahren versagen natürlich im sauren Bereich, wo die H^+ -Ionenkonzentration gegenüber der durch Esterspaltung bedingten Konzentrationszunahme von H^+ -Ionen zu groß ist. Wird jedoch, wie in unserem Falle, bei pH-Werten von 7 und darüber titriert, so sind rund 90 % der vorhandenen sekundären Phosphatgruppen (pK bei 6) dissoziiert. Es ist daher unwahrscheinlich, daß freigesetzte Protonen von Phosphat gebunden und in nennenswertem Umfang der Titration entzogen werden. Da alle unspezifischen Nebenreaktionen, die Säure liefern oder verbrauchen, miterfaßt werden, muß das Enzym zumindest teilgereinigt sein. Als besonders nachteilig für den routinemäßigen Test erweist sich, daß gepufferte Lösungen jeweils sorgfältig dialysiert werden müssen. Bei der Messung des Zuwachses säurelöslicher Spaltprodukte ist zu bedenken, daß für die Anfangsstadien des DNA-Abbaus durch DNasen keine Proportionalität zwischen der Zahl der gespaltenen Phosphodiesterbindungen und der Säurelöslich-

keit der Spaltprodukte besteht. Daher wurde diese Methode im Langzeitversuch eingesetzt. Bei Verfolgung des zeitlichen Ablaufs der Freisetzung säurelöslicher Spaltprodukte stellte sich jedoch heraus, daß in späteren Reaktionsstadien die Extinktionsänderungen pro Zeiteinheit wesentlich geringer werden. Substratmangel bzw. Hemmung durch Produkte vermögen dieses Verhalten nur ungenügend zu erklären, da, wie bei allen Endonucleasen, die Produkte früher Reaktionsstadien in späteren als Substrat dienen. Nur scheinen, und das konnte auch für andere Nucleasen nachgewiesen werden, (38), die nachfolgenden Produkte zunehmend schlechtere Substrate zu sein. LASKOWSKI (2) hat für dieses Phänomen den Namen Autoretardation vorgeschlagen. Besonders wenn durch Zusätze zum Inkubat (zum Beispiel Aktivierung durch Ionen) die Reaktionsgeschwindigkeit stark verändert wird, kommt dieses Phänomen ins Spiel: hohe Aktivitäten werden relativ zu niedrig bestimmt und Unterschiede in diesem Bereich leicht übersehen.

Viskosimetrisch erfaßt man zeitlich viel frühere Stadien der DNase/DNA-Reaktion als bei Verfolgung der Säurelöslichkeit. Neben der Einfachheit und Genauigkeit der Messung von Viskositäten, sowie der Möglichkeit, die Reaktion in kurzen Zeitabständen zu verfolgen, besteht der Vorteil einer viskosimetrischen Aktivitätsbestimmung vor allem in ihrer hohen Empfindlichkeit. Liegt Endonuclease-Wirkung vor, so genügt bereits eine kleine Anzahl gespaltener Phosphodiesterbindungen, um einen beträchtlichen Abfall der Viskosität einer DNA-Lösung hervorzurufen. Man muß sich aber auch hier bewußt sein, daß die gemessenen Größen nicht direkt proportional der Reaktionsgeschwindigkeit (in Mol hydrolysierter Phosphodiesterbindungen pro Zeiteinheit) sind. Eine solche Beziehung läßt sich jedoch, wie LE PECQ und BOURGOIN (98) zeigen konnten, herstellen. Sie erlaubt, wenn präzise experimentelle Bedingungen eingehalten werden, die exakte Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit aus dem Abfall der spezifischen Viskosität. Eine strikte Proportionalität zu Zeit und Enzymmenge in größeren Bereichen darf

nicht erwartet werden, dies ist nicht Ausdruck des Auto-retardation-Phänomens, sondern der Tatsache, daß spätere Spaltungen einen immer geringeren Effekt auf die Viskosität ausüben. Daraus folgt, daß für exakte Messungen den Enzymkonzentrationen enge Grenzen gesetzt sind.

Mit der hier verwendeten Technik nahm die spezifische Viskosität der DNA-Lösung unter DNase-Einwirkung auch in der Anfangsphase gleichmäßig ab, eine Verzögerungsphase konnte nicht beobachtet werden. ZAMENHOF et al. (99), die ebenfalls eine viskosimetrische Technik benutzten, haben als erste auf die Existenz einer solchen "lag-period" hingewiesen. Ihre Befunde sind später bestätigt und erweitert worden (46). Man weiß heute (DOTY (100) und THOMAS (86)), daß während der ersten Phase des Abbaus durch DNasen das DNA-Molekül seine originale Struktur als Doppel-Helix nach WATSON und CRICK ^{x)} bewahrt. Dann können aber nur Einzelstrang-Schnitte, die auf den beiden Polynucleotid-Strängen eng benachbart liegen, zu einem Querbruch des DNA-Moleküls führen. Die Wahrscheinlichkeit dafür ist in den Anfangsstadien geringer und es resultiert eine Verzögerungsphase. Unter Ablehnung der Hypothese einer Hydrolyse durch Doppelstrang-Schnitte, muß das Fehlen einer Verzögerungsphase auf den bei unseren Messungen angewandten hohen Schergradienten und die, da zur Ablesung der Messvorgang gestoppt wird, zusätzlich auftretenden Verzögerungs- und Beschleunigungskräfte zurückgeführt werden.

2. Darstellungsverfahren

Bei der Extraktion von Desoxyribonucleasen aus Geweben ist zu beachten, daß diese Enzyme in Partikelbindung vorliegen, daß sie sekundär proteolytisch verändert werden können und daß Inhibitoren von Proteincharakter offenbar sehr weit verbreitet sind (21). Einer maximalen Aktivitätsausbeute aus Geweben muß daher besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden. Aus *Verongia aerophoba* lassen sich durch Arbeiten

^{x)} J.D. Watson and F.H.C. Crick: "A Structure for Desoxyribose Nucleic Acid". *Nature* 171, 737-738 (1953).

bei hohen Ionenstärken DNase-Aktivitäten extrahieren, die etwa 1/20 der Aktivität, die aus der gleichen Menge Rinderpankreas gewonnen wird, betragen. Zweifellos ist mit diesem Verfahren das Problem, die Schwammnuclease in hinreichend hoher Konzentration und guter spezifischer Aktivität aus dem Trockenpulver zu extrahieren, nur unvollkommen gelöst. Es wäre aber ein Säulenverfahren denkbar, bei dem das Trockenpulver mit einer Ammoniumsulfat-Lösung fallender Ionenstärke eluiert wird. Dabei müßte eine Konzentration gefunden werden, bei der die Desoxyribonuclease abgelöst und daher in einem kleinen Volumen, relativ konzentriert und mit besserer spezifischer Aktivität ausgewaschen werden kann. Salzgehalt und Volumen des Extraktes hätten den Einsatz von Ionenaustauschern in diesem Stadium sehr erschwert, deshalb ist die Fällung mit Neutralsalzen zur weiteren Reinigung herangezogen worden. Diese Schritte dienen einer groben Vorfraktionierung und sind bewußt auf möglichst hohe Ausbeuten angelegt.

Eine Entsalzung der erhaltenen Lösung ist außer durch Dialyse auch durch die von PORATH u. FLODIN (101) beschriebene Gelfiltration möglich. Dieses Verfahren arbeitet rascher und ist daher viel schonender als die Dialyse. Da jedoch der Magnesiumsulfat-Extrakt seiner hohen Viskosität wegen nur verdünnt aufgetragen werden kann, das Gelbettvolumen aber das 15-fache der zu entsalzenden Lösung betragen soll, wird die Gelfiltration als Säulenverfahren für unsere Zwecke zu aufwendig.

Die stabilisierende Wirkung von Magnesium-Ionen bei der Dialyse ist auch von DESREUX et al (44) für DNase-II-Enzyme beschrieben worden. Der Einfluß des Substrats wurde dabei nicht untersucht, es ist jedoch in anderem Zusammenhang gezeigt worden, daß DNA-Gegenwart einen spezifischen Schutz der DNase vor Strahleninaktivierung bewirkt (102).

Die fraktionierte Elution der Probe von der Phosphat-Cellulose-Säule hat den Vorteil, daß das Enzym in einem scharfen Gipfel erscheint. Wird nämlich die Entwicklung mit einem Ionenstärkegradienten (Bedingungen wie bei CM-Sephadex) aus-

geführt, so erscheint die DNase sehr verdünnt (Extinktion bei 280 nm ca. 0.08) und ist nur unter hohen Verlusten zu konzentrieren. An DEAE-Cellulose kann die Schwammnuclease bei einem pH von 7,6 und einer Ionenstärke von 0,05 M Phosphat vollständig adsorbiert werden, die nachfolgende Elution bietet aber gegenüber dem gewählten Verfahren keinen nennenswerten Vorteil. Soll an DEAE-Cellulose chromatographiert werden, so müßte der Phosphat-Puffer besser durch einen kationischen Puffer, wie zum Beispiel den Tris-HCl-Puffer, ersetzt werden. Dadurch würde sich das Reinigungsverfahren weiter komplizieren, sodaß diese Möglichkeit nicht weiterverfolgt wurde.

Da auch nach der Gradientenelution an CM-Sephadex keine einheitliche Fraktion erhalten wird, stellt sich die Frage nach einer möglichen weiteren Reinigung. Hier könnte der Übergang auf CM-Cellulose, die eine geringere Schrumpfungstendenz hat als Austauscher auf Sephadex-Basis und daher einen gleichmäßigeren Ablauf des Ionenstärkegradienten gewährleistet, einen Fortschritt bringen. Andere Ionenaustauscher, wie Amberlite IRC-50 und Hydroxylapatit, erwiesen sich bei orientierenden Versuchen als weniger geeignet.

Eine Desorption durch kontinuierliche Veränderung des pH-Wertes des Elutionsmittels erscheint wenig aussichtsreich, da die Abnahme der Ladung des Austauschers durch eine Zunahme der Ladung der amphoteren Gegenionen des Proteins kompensiert wird, oder umgekehrt. Gelingt es allerdings das Enzym bei einem pH in der Nähe seines isoelektrischen Punktes am Austauscher zu adsorbieren, so wird eine Entwicklung der Probe durch einen pH-Gradienten möglich. Da die Desoxyribonuclease aus *Verongia aerophoba* ein stark basisches Protein darstellt, kämen für ein solches Vorgehen nur Austauscher vom Typ der DEAE-Cellulose in Betracht.

Die Ergebnisse der hier nur analytisch eingesetzten Disc-Elektrophorese lassen auch an eine Reindarstellung des Enzyms mittels präparativer Elektrophorese denken. Dazu könnte eventuell die Disc-Elektrophorese herangezogen werden, MAIZEL (103) hat eine solche Anordnung für präparative Zwecke

beschrieben, dann könnten die bereits erarbeiteten Versuchsbedingungen direkt übernommen werden.

3. Enzymeigenschaften

Die DNase aus *Verongia aerophoba* hat mit dem Enzym aus Pankreas einige charakteristische Gemeinsamkeiten: das pH-Optimum im neutralen bis leicht alkalischen Bereich, die Notwendigkeit zweiwertiger Kationen zur Aktivität und die Empfindlichkeit gegenüber hohen Ionenstärken. Im Gegensatz zur Pankreas-DNase, die mit einem Molekulargewicht von ca. 60.000 und einem isoelektrischen Punkt von 4,7 ein Albumin-Typ-Protein ist, stellt die Schwammnuclease ein ganz anderes Protein dar. In seiner ausgesprochenen Basizität ähnelt es den bisher beschriebenen DNase-II-Enzymen.

Der hier erhobene Befund, daß Mg^{++} -Ionen besser aktivieren als Mn^{++} -Ionen und Ca^{++} -Ionen keine synergistische Wirkung ausüben, steht in Widerspruch zu den in der Einleitung zitierten Daten WIBERG's (43). Allerdings kommen SHACK und BYNUM (104), die diese Frage nachuntersuchten, zu ganz ähnlichen Ergebnissen, wie sie hier für die DNase aus *Verongia aerophoba* beschrieben sind.

Die Ursache für die sich teilweise widersprechenden Informationen über pH-Optimum und Elektrolytkonzentrationen liegen einmal an den verschiedenen verwendeten Methoden und zum anderen an der Unterschiedlichkeit und Herkunft der Enzympräparate. Im wesentlichen aber wohl daran, daß pH und Elektrolytkonzentration nicht unabhängige Variable sind: sondern das pH-Optimum von der Elektrolytkonzentration abhängig ist, das Elektrolytoptimum mit dem gewählten pH variiert und diese Abhängigkeiten für die verschiedenen Ionen verschieden sind. Wie stark die Ergebnisse über die Aktivierung durch verschiedene Kationen außerdem von der Zusammensetzung des Substrats abhängen, konnte BOLLUM (105) zeigen, dem es gelang Desoxyribopolymere, die aus den jeweils komplementären Strängen der beiden Homopolymere zusammengesetzt waren, zu synthetisieren und deren Abbaubarkeit durch DNase-I zu prüfen.

Es ist nicht klar auf welche Weise Elektrolyte die DNase/DNA-Reaktion beschleunigen. Die Annahme einfacher stöchiometrischer Verbindungen mit entweder dem Substrat oder dem Enzym reicht als alleinige Basis wohl nicht aus (43). Am meisten drängt sich die Ähnlichkeit mit der Chelat-Stabilitäts-Konstanten auf, die ebenfalls pH-abhängig ist, durch die Ladung der Ionen, den Ionenradius und die Konfiguration des komplexierenden Moleküls (die letzten beiden Faktoren bestimmen sterische Verhältnisse) beeinflusst wird. Das Wechselspiel all dieser Faktoren könnte die strenge Spezifität der einzelnen Ionen erklären.

Der Befund, daß es unter Einwirkung von Verongia-DNase zu einem raschen Abfall der Viskosität ohne entsprechendes Auftreten niedermolekularer Produkte kommt, läßt Rückschlüsse auf die Art der Reaktion mit DNA zu. Es ist danach unwahrscheinlich, daß das Enzym wirkt, indem es relativ kurze Fragmente von den Enden des DNA-Moleküls abspaltet. Vielmehr machen die Ergebnisse wahrscheinlich, daß diese DNase die Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen überall im DNA-Molekül katalysiert, wobei die entstehenden Produkte, zumindest in den frühen Reaktionsstadien, so hochmolekular sind, daß sie mit Lanthannitrat-HCl fällbar bleiben. Dies berechtigt, einen endonucleolytischen Reaktionstyp für die Schwammnuclease anzunehmen.

Vergleicht man den Abbau hitzedenaturierter DNA mit dem nativer DNA, so könnte für die zweite, langsamere Phase der Hydrolyse nativer DNA eine andere Deutung gegeben werden. Danach wäre nicht die Zunahme resistenter Bindungen (Autor retardation-Phänomen) Ursache der Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit, sondern die Tatsache, daß der DNA-Doppelhelix, sobald eine genügende Anzahl Diesterbindungen gespalten ist, zu Fragmenten reduziert wird, die nicht länger über Wasserstoffbrückenbindungen verfügen. Einzelstrangige Poly- bzw. Oligonucleotide, das zeigt der Abbau hitzedenaturierter DNA, erlauben aber nur wesentlich geringere Hydrolyseraten. Bei Betrachtung der Reaktionsgeschwindigkeit/Temperatur-Kurve fällt auf, daß jenseits 35 °C der Aktivitätszuwachs

abnimmt. Dies ist darauf zurückzuführen, daß das Enzym in vitro (allerdings werden Schwammnucleasen auch in vivo niemals solchen Temperaturen ausgesetzt) bereits bei relativ niedrigen Temperaturen eine merkliche Inaktivierung erfährt. Unsere Kurve ist demnach die Resultante zweier entgegengesetzter Prozesse: der Aktivierung im eigentlichen Sinne und der Inaktivierung des Enzyms. Die zur Inaktivierung notwendigen Energiebeträge sind jedoch sehr hoch, ihr Q_{10} liegt fast eine Zehnerpotenz höher als das kritische Inkrement der Aktivierung. Das bedeutet, daß die Inaktivierungsgeschwindigkeit in einem sehr kleinen Temperaturintervall von sehr geringen Werten zu fast momentanem Ablauf ansteigt und so einen Inaktivierungspunkt vortäuscht. Die große Differenz beider Q_{10} -Werte erklärt gleichzeitig die starke Asymmetrie der Kurve nach Erreichen des Temperaturoptimums.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein Verfahren beschrieben, das bei 30 % Ausbeute zu einer 5000-fachen Reinigung einer Desoxyribonuclease aus dem Meeresschwamm *Verongia aerophoba* führt. Trotz der hohen Reinigung erweist sich das Präparat in der Disc-Elektrophorese als nicht einheitlich. Es enthält aber, außer Spuren von Ribonuclease, weder Phosphodiesterase- noch Phosphatase-Aktivitäten.

Diese Schwammnuclease stellt ein basisches Protein dar, sie hat ein pH-Optimum von 7,6 und benötigt zwei-wertige Kationen zur Aktivität. Desoxyribonucleinsäure wird durch endonucleolytischen Angriff hydrolysiert, wobei das native Substrat ca. 7 mal höhere Reaktionsgeschwindigkeiten zulässt als das hitzedenaturierte. Für die Reaktion mit nativer DNA wird der Temperaturkoeffizient Q_{10} zu 1,8 bestimmt, das Temperaturoptimum liegt bei 45 °C. Die Michaelis-Konstante des Enzyms beträgt $2,2 \times 10^{-3}$ M.

An dieser Stelle möchte ich meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Rudolf K. Zahn, für die Förderung, die er dieser Arbeit hat angedeihen lassen, aufrichtig danken.

VII. LITERATUR

1. Siebert, G.: "Desoxyribonucleasen". In Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiol. u. pathol. chem. Analyse, 10. Auflage, Band VI B, S. 1061 ff; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1966).
2. Laskowski, M.: "Desoxyribonucleases". In Boyer-Lardy-Myrbäck (Eds.): The Enzymes, 2nd Edition, Vol. V, p. 123 ff; Academic Press, Inc., New York (1961).
3. Kurnick, N.B.: "The Assay of Desoxyribonucleases". In D.Glick (Ed.): Methods of Biochemical Analysis, Vol. IX, p. 1 ff; Interscience Publishers, New York (1962).
4. Cunningham, L.: "Micrococcal Nuclease and some Products of Its Action".
Ann. N.Y. Acad. Sci. 81 788 (1959)
5. Stevens, A. and R.J.Hilmoe: "Studies on a Nuclease from Azotobacter agilis".
J. biol. Chem. 235 3023 (1960)
6. Enzyme Nomenclature, Recommendations 1964 of the International Union of Biochemistry.
Elsevier-Publishing-Company, Amsterdam-London-New York (1965).
7. Kunitz, M.: "Crystalline Desoxyribonuclease".
Science 108 19 (1948)
8. Maver, M.E. and A.E.Greco: "The Hydrolysis of Nucleo-
proteins by Cathepsins from Calf Thymus".
J. biol. Chem. 181 853 (1949)
9. Araki, T.: "Über die Zersetzung der Nucleinsäure".
Z. physiol. Chem. 38 84 (1903)
10. Sachs, F.: "Über die Nuclease".
Z. physiol. Chem. 46 337 (1905)
11. Kunitz, M.: "Crystalline Desoxyribonuclease. I. Isolation and General Properties, Spectrophotometric Method for the Measurement of DNase-Activity. II. Digestion of Thymus Nucleic Acid. The Kinetics of the Reaction".
J. gen Physiol. 33 349 (1950)
363
12. Keller, P.J., E.Cohen and H.Neurath: "The Proteins of Bovine Pancreatic Juice".
J. biol. Chem. 233 344 (1958)
13. Greene, L.J., C.H.W.Hirs and G.E.Palade: "On the Protein Composition of Bovine Pancreatic Zymogen Granules".
J. biol. Chem. 238 2054 (1963)

14. Allfrey, V. and A.E. Mirsky: "Some Aspects of the Desoxyribonuclease Activities of Animal Tissues".
J. gen. Physiol. 36 227 (1952)
15. Maver, M.E. and A.E. Greco: "Purification of Nucleases of Calf Spleen".
Federation Proceedings 13 261 (1954)
16. Siebert, G., K. Lang, S. Lucius-Lang, L. Herkert, G. Stark, G. Rossmüller und H. Jöckel: "Eigenschaften und Bedeutung der Desoxyribonuclease aus Säugetierorganen".
Z. physiol. Chem. 295 229 (1953)
17. Kowlessar, O.D., K.I. Altman and L.H. Hempelmann: "The Effect of Ionizing Radiation on DNase Activities of Body Fluids".
Arch. Biochem. Biophys. 52 362 (1954)
18. Koszalka, T.R., K. Schreiner and K.I. Altman: "The Separation of two urinary Desoxyribonucleases".
Biochim. biophys. Acta 15 194 (1954)
19. McCarty, M.: "The Inhibition of Bovine Pancreatic Desoxyribonuclease by Rabbit Antiserum".
J. gen. Physiol. 29 123 (1946)
20. Feinstein, R.N.: "Activation of the Neutral Deoxyribonuclease".
J. biol. Chem. 235 733 (1960)
21. Cooper, E.J., M.L. Trautmann and M. Laskowski: "Occurrence and Distribution of an Inhibitor for Desoxyribonuclease in Animal Tissues".
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 73 219 (1950)
22. Dabrowska, W., E.J. Cooper and M. Laskowski: "A Specific Inhibitor for Desoxyribonuclease".
J. biol. Chem. 177 991 (1949)
23. Henstell, H.H., R.I. Freedman and B. Ginsburg: "An Inhibitor of Desoxyribonuclease in Human White Blood and Bone Marrow Cells, and Its Relationship to Cellular Maturity".
Cancer Res. 12 346 (1952)
24. Docter, V.M.: "Inhibition of Deoxyribonuclease-I of Human Serum by Nitrogen Mustard or Leucocyte Extracts".
Arch. Biochem. Biophys. 96 475 (1962)
25. Gupta, S. and R.M. Herriott: "Nucleases and Their Inhibitors in the Cellular Components of Human Blood".
Arch. Biochem. Biophys. 101 88 (1963)
26. Keir, H.M., R.M.S. Smellie and G. Siebert: "Intracellular Location of DNA-Nucleotidyltransferase".
Nature 196 752 (1962)

27. Straus, W.: "Concentration of Acid Phosphatase, Ribonuclease, Desoxyribonuclease, B-Glucuronidase, and Cathepsin in "Droplets" isolated from the Kidney Cells of normal Rats".
J. biophys. biochem. Cytol. 2 513 (1956)
28. Scack, J.: "Desoxyribonucleases of Mouse Tissues".
J. biol. Chem. 226 573 (1957)
29. Beaufay, H., D.S. Bendall, P. Baudhuin and C. de Duve: "Tissue Fraction Studies".
Biochem. J. 73 623 (1959)
30. Kurnick, N.B.: "Mechanism of Deoxyribonuclease Depolymerisation".
J. Am. Chem. Soc. 76 417 (1954)
31. Hodes, M.E. and K.M. Swenson: "Purification of Desoxyribonuclease-II from Calf Spleen".
Biochim. biophys. Acta 61 612 (1962)
32. McDonald, M.R.: "Desoxyribonuclease from Salmon Testes".
J. gen. Physiol. 45(Suppl.) 77 (1963)
33. Hippel, P.H. and G. Felsenfeld: "Micrococcal Nuclease as a Probe of DNA Conformation".
Federation Proceedings 22 349 (1963)
34. Tamm, C. and E. Chargaff: "Specific Requirements for the Action of Desoxyribonuclease".
Nature 168 916 (1951)
35. Tamm, C., H.S. Shapiro and E. Chargaff: "Correlations between the Action of Pancreatic-Desoxyribonuclease and the Nature of Its Substrates".
J. biol. Chem. 199 313 (1952)
36. Lunt, M.R., J.C. Siebke and K. Burton: "Glucosylated Nucleotide Sequences from T2-Bacteriophage Desoxyribonucleic Acid".
Biochem. J. 92 27 (1964)
37. Vanecko, S. and M. Laskowski: "Terminal Nucleosides in the Fragments of Desoxyribonucleic Acid produced by the Action of Splenic Desoxyribonuclease-II".
Biochim. biophys. Acta 61 547 (1962)
38. Vanecko, S. and M. Laskowski: "Studies of the Specificity of Desoxyribonuclease-I".
J. biol. Chem. 236 3312 (1961)
39. Privat de Garilhè, M. and M. Laskowski: "Study of the Enzymatic Degradation of Desoxyribonucleic Acid by two different Desoxyribonucleodepolymerases".
J. biol. Chem. 215 269 (1955)

40. Laskowski, M.: "Enzymes Hydrolyzing DNA".
Ann. N.Y. Acad. Sci. 81 776 (1959)
41. Zahn, R.K., E. Tiesler, A.K. Kleinschmidt und D. Lang: "Ein Konservierungs- und Darstellungsverfahren für Desoxyribonucleinsäure und ihre Ausgangsmaterialien".
Biochem. Z. 336 281 (1962)
42. Miyaji, T. and J.P. Greenstein: "Cation Activation of Deoxyribonuclease".
Arch. Biochem. Biophys. 32 414 (1951)
43. Wiberg, J.S.: "On the Mechanism of Metal Activation of Deoxyribonuclease-I".
Arch. Biochem. Biophys. 73 337 (1958)
44. Desreux, V., R. Hacha and E. Frédéricq: "Activation of Deoxyribonuclease by Divalent Cations".
J. gen. Physiol. 45(Suppl.) 93 (1962)
45. Kurnick, N.B. and G. Sandeen: "Interdependence of pH and Electrolyte Concentration Optimum for Acid Desoxyribonuclease Activity".
Arch. Biochem. Biophys. 85 323 (1958)
46. Young, E.T. and R.L. Sinsheimer: "A Comparison of the Initial Actions of Spleen Deoxyribonuclease and Pancreatic Deoxyribonuclease".
J. biol. Chem. 240 1274 (1965)
47. Conolly, J.H., R.M. Herriott and S. Gupta: "Deoxyribonuclease in Human Blood and Platelets".
Brit. J. exp. Pathol. 43 392 (1962)
48. Ito, Y. and C.A. Evans: "Induction of Tumors in domestic Rabbits with Nucleic Acid Preparations from partially purified Shope Papilloma Virus and Extracts of the Papilloma of Domestic and Cottontail Rabbits".
J. exp. Med. 144 485 (1961)
49. Hodes, M.E., C.G. Palmer, L.E. Beatty, K.M. Swanson and J.D. Hubbard: "Infectivity Experiments with Nucleic Acids of the Shope Rabbit Papilloma and derived Carcinomas".
J. natl. Can. Inst. 30 1 (1963)
50. Borenfreund, E. and A. Bendich: "A Study of Penetration of Mammalian Cells by Deoxyribonucleic Acid".
J. biophys. biochem. Cytol. 9 81 (1961)
51. Herriott, R.M.: "Infectious Nucleic Acids, A New Dimension of Virology".
Science 134 256 (1961)
52. Herriott, R.M., J.H. Conolly and S. Gupta: "Blood Nucleases and Infectious Viral Nucleic Acids".
Nature 189 817 (1961)

53. Zahn, R.K., A. Docter, B. Heicke, H. Kuhlmann, G. Ochs, E. Torz, R. Torz, W. Ziegler and G. Zahn: "A Biological Action of Injected Deoxyribonucleic Acid".
Nature 182 1679 (1958)
54. Zahn, R.K.: "Desoxyribonucleases as Growth Substances".
Biochem. J. 76 66P (1960)
55. Zahn, R.K.: "A Biological Action of Desoxyribonuclease-I on the Growth of *Euglena gracilis*".
Nature 184 1324 (1959)
56. Kiefer, G., R. Kiefer, G. Zahn und R. K. Zahn: "Über Desoxyribonucleinsäuren und Desoxyribonucleasen. Der Einfluß von DNS und Nucleotiden auf die DNase-Wirkung am Seeigel-Ei".
Biochem. Z. 334 49 (1961)
57. Zahn, R.K. und G. Kiefer: "Über den Einfluß von Desoxyribonuclease-I auf die Entwicklungsgeschwindigkeit von Amphibieneiern".
Exp. Cell Res. 19 460 (1960)
58. Brody, S. and B. Thorell: "Ribonuclease and Deoxyribonuclease Activities in Normal and Regenerating Bone Marrow Homogenates".
Biochim. biophys. Acta 25 579 (1957)
59. Brody, S.: "Deoxyribonuclease Activities and Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Normal, Regenerating, Pre-cancerous, and Cancerous Rat Liver".
Nature 182 1386 (1958)
60. Friedrich-Freska, H. und F.G. Zaki: "Spezifische Mitose-Auslösung in normaler Rattenleber durch Serum von partiell hepatektomierten Ratten".
Zschr. Naturforsch. 9b 394 (1954)
61. Stern, H.: "Periodic Induction of Deoxyribonuclease Activity in Relation to the Mitotic Cycle".
J. biophys. biochem. Cytol. 9 271 (1961)
62. Kurnick, N.B.: "The Effect of Aging on the Desoxyribonuclease System. Body and Organ Weight, and Cellular Content".
J. Lab. clin. Med. 58 934 (1961)
63. Tissieres, A. and J.W. Hopkins: "Factors Affecting Amino Acid Incorporation into Protein by *E. coli* Ribosomes".
Proc. natl. Acad. Sci. 47 2015 (1961)
64. Wood, W.B. and P. Berg: "The Effect of enzymatically synthesized RNA on Amino Acid Incorporation by a soluble Protein-Ribosome System from *E. coli*".
Proc. natl. Acad. Sci. 48 94 (1962)

65. Daoust, R. and H. Amand: "Histochemical Analysis of Deoxyribonuclease and Ribonuclease Activities in Experimental and Human Tumors".
Proc. Am. Assoc. Can. Res. 3 218 (1959)
66. Daoust, R. and A. Cantero: "The Distribution of Deoxyribonuclease in Normal, Cirrhotic and Neoplastic Rat Livers".
J. Histochem. Cytochem. 7 139 (1959)
67. DeLamirande, G.: "Action of Deoxyribonuclease and Ribonuclease on the Growth of Ehrlich Ascites Carcinoma in Mice".
Nature 192 52 (1961)
68. Sugiura, K. and H. J. Creech: "Merits of Ascites Tumor for Chemotherapeutic Screening".
Ann. N.Y. Acad. Sci. 63 962 (1956)
69. Kornberg, A.: "Biologic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid".
Science 131 1503 (1960)
70. Lehmann, I. R.: "Enzymatic Synthesis of Desoxyribose Nucleic Acid".
Ann. N.Y. Acad. Sci. 81 745 (1959)
71. Cairns, J.: "The bacterial Chromosome and its manner of Replication as seen by autoradiographie".
J. mol. Biol. 6 208 (1963)
72. Jaenisch, R., P. H. Hofschneider und A. Preuss: "Über infektiöse Strukturen bei E. coli Bacteriophagen".
J. mol. Biol. 21 501 (1966)
73. Zahn, R. K., G. Zahn und E. Tiesler: "DNase-Aktivität und DNA-Synthese in sich entwickelnden Seeigelleiern".
Herbsttagung der Gesellschaft für Physiologische Chemie in Marburg, 13-15. Oktober 1966.
74. Zahn, R. K., E. Tiesler, G. Ochs, B. Heicke, W. Forster, W. Hanske und D. Lang: "DNase-Inhibierung nach physikalischer Einwirkung auf DNA-Lösung".
Biochem. Z. 341 502 (1965)
75. Zahn, R. K., E. Tiesler, G. Ochs, B. Heicke, W. Hanske und W. Forster: "Eigenschaften und Wirkung modifizierter Desoxyribonucleinsäuren".
Biochem. Z. 344 26 (1966)
76. Salmon, A., J. A. Herschfuss and M. S. Segal: "Aerosols of Pancreatic Dornase in Bronchopulmonary Disease".
Ann. Allergy 12 71 (1954)
77. Madden, J. F. and H. G. Ravits: "Enzyme Debridement of Indolent Infected Cutaneous Ulcers".
J. Am. med. Ass. 149 1616 (1952)

78. Glen, J.F.: "Urologic Use of Pancreatic Dornase: A Preliminary Clinical Trial".
J. of Urology 83 485 (1960)
79. Ayzazian, J.H., A.J. Johnson and W.S. Tillet: "The Use of Parenterally Administered Pancreatic Desoxyribonuclease as an Adjunct in the Treatment of Pulmonary Abscesses".
Am. Rev. of Tuberculosis and Pulmonary Diseases 76 1 (1957)
80. Tillet, W.S. and S. Sherry: "The Effect in Patients of Streptococcal Fibrinolysin and Streptococcal Desoxyribonuclease on Fibrinous, Purulent and Sanguinous Pleural Exudation".
J. clin. Investigation 28 173 (1949)
81. Miller, J.M. and P.H. Long: "Reaction to Streptokinase and Streptodornase".
J. Am. med. Ass. 150 814 (1952)
82. Knight, V., R.C. Hardy and J. Negrin: "Meningitis Due to Pseudomonas aeruginosa. Intrathecal Treatment with Streptokinase and Streptodornase and intramuscular and intrathecal Treatment with Neomycin".
J. Am. med. Ass. 149 1395 (1952)
83. Trice, P.A. and I.E. Townsend: "Meningitis Due to Klebsiella pneumoniae. Report of two cases, with the Use of Streptokinase and Streptodornase in one case".
J. Am. med. Ass. 149 1471 (1952)
84. Johnson, A.J., Ayzazian, J.H. and W.S. Tillet: "Crystalline Desoxyribonuclease as an Adjunct in the Treatment of Pneumococcal Meningitis".
New Engl. J. of Med. 260 893 (1959)
85. Riedel, R.: "Porifera". In Fauna und Flora der Adria, S. 105 ff; Verlag Paul Parey, Hamburg u. Berlin (1963)
86. Thomas jr., C.A.: "The Enzymatic Degradation of Desoxyribose Nucleic Acid".
J. Am. Chem. Soc. 78 1861 (1956)
87. Daoust, R.: "Demonstration of RNase and DNase activities by substrate-film methods".
Nature 210 1077 (1966)
88. Heinicke, H. und H. Venner: "Eine quantitative Bestimmung von Nucleasen. II. Mitteilung: Desoxyribonuclease".
Zschr. Naturforsch. 13b 576 (1958)
89. Zahn, R.K. und I. Stahl: "Die kontinuierliche Extraktion von Stoffgemischen unter Änderung eines Parameters nach dem Volumenersatzprinzip".
Z. physiol. Chem. 293 1 (1953)

90. Winter, J.E. and A.W. Bernheimer: "The Deoxyribonucleases of *Streptococcus pyogenes*".
J. biol. Chem. 239 215 (1964)
91. Kalnitsky, G., J.P. Hummel, H. Resnick, J.R. Carter, L.B. Barnett and C. Dierks: "The Relation of Structure to Enzymatic Activity in Ribonuclease".
Ann. N.Y. Acad. Sci. 81 542 (1959)
92. Koerner, J.F. and R.L. Sinsheimer: "A Deoxyribonuclease from Calf Spleen. I. Purification and Properties".
J. biol. Chem. 228 1039 (1957)
93. Garen, A. and C. Levinthal: "A Fine-Structure, Genetic, and Chemical Study of the Enzyme Alkaline Phosphatase of *E. coli*. I. Purification and Characterisation of Alkaline Phosphatase".
Biochim. biophys. Acta 38 470 (1960)
94. Ornstein, L.: "Disc-Electrophoresis. I. Background and Theory".
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 321 (1964)
95. Davis, B.J.: "Disc-Electrophoresis. II. Application to Human Serum Proteins".
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 404 (1964)
96. Reisfeld, R.A., U.J. Lewis and D.E. Williams: "Disc-Electrophoresis of Basic Proteins and Peptides on Polyacrylamid Gels".
Nature 195 281 (1962)
97. Lineweaver, H. and D. Burk: "The Determination of Enzyme Dissociation Constants".
J. Am. Chem. Soc. 56 658 (1934)
98. LePecq, J.B. et D. Bourgoïn: "Étude théorique et expérimentale des conditions d'utilisation de la viscosimétrie pour la détermination de l'activité désoxyribonucléasique-I".
Biochim. biophys. Acta 80 173 (1964)
99. Zamenhof, S., G. Griboff and N. Marullo: "Studies on the Resistance of Desoxyribose Nucleic Acid to Physical and Chemical Factors".
Biochim. biophys. Acta 13 459 (1954)
100. Doty, P., B. McGill and S.A. Rice: "The Properties of Sonic Fragments of Desoxyribose Nucleic Acid".
Proc. natl. Acad. Sci. 44 432 (1958)
101. Porath, J. and P. Flodin: "Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation".
Nature 183 1657 (1959)

102. Okada, S.: "Inactivation of Deoxyribonuclease by X-Rays
I. The Mechanism of Inactivation in Aqueous Solution".
Arch. Biochem. Biophys. 67 95 (1957)
103. Maizel, J.V.: "Preparative Disc-Elektrophoresis".
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121 364 (1964)
104. Shack, J. and B. Bynum: "Interdependance of Variables
in the Activation of Deoxyribonuclease-I".
J. biol. Chem. 239 3834 (1964)
105. Bollum, J.F.: "Degradation of the Homopolymer Complexes
Polydeoxyadenylate-Polydeoxythymidylate, Polydeoxy-
inosinate-Polydeoxycytidylate, and Polydeoxyguanylate-
Polydeoxycytidylate by Deoxyribonuclease-I".
J. biol. Chem. 240 2599 (1965)

VIII. LEBENS LAUF

Am 19. Dezember 1939 wurde ich als Sohn des Assistenzarztes Dr. Leopold Diener und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Neu, in Leipzig geboren.

Von 1946 bis 1953 besuchte ich die Geschwister Scholl-Volksschule in Leipzig. Im Herbst 1953 übersiedelte meine Familie in die Bundesrepublik. Hier besuchte ich das Leibniz-Realgymnasium in Frankfurt Höchst, das ich 1960 mit dem Zeugnis der Reife verließ.

Im Sommersemester 1960 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt, wo ich 1961 das Vorphysikum, 1963 das Physikum und 1966 das Staatsexamen ablegte.

Nach Bestehen des Staatsexamens arbeitete ich unter Herrn Prof. Dr. R. K. Zahn zunächst am Institut für vegetative Physiologie der Universität Frankfurt und später am Institut für chemische Physiologie der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz.

Anschließend begann ich den klinischen Teil meiner Ausbildung als Medizinalassistent.

BAMBERGER FOTODRUCK · RUDOLF RODENBUSCH
8600 BAMBERG · Markusplatz 22 · Telefon: 0951/26794